

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

This Page Blank (uspto)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07H 13/06, C12P 19/04	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/15496 (43) Date de publication internationale: 17 octobre 1991 (17.10.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00283 (22) Date de dépôt international: 5 avril 1991 (05.04.91) (30) Données relatives à la priorité: 90/04764 6 avril 1990 (06.04.90) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75700 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (I.N.R.A.) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : LEROUGE, Patrice [FR/FR]; 23, rue de la Digue, F-31300 Toulouse (FR). ROCHE, Philippe [FR/FR]; 58, avenue de Ranguel, Appt. 17, F-31400 Toulouse (FR). FAUCHER, Catherine [FR/FR]; 16, rue Baudelaire, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). MAILLET, Fabienne [FR/FR]; 14, résidence des Jardins Occitans, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR). DENARIE, Jean [FR/FR]; 18, rue du Moulin, F-31320 Castanet-Tolosan (FR). PROMÉ, Jean-Claude [FR/FR]; 9, lotissement La Bergerie, F-31320 Pechbusque (FR). TRUCHET, Georges [FR/FR]; 9, chemin de la Mairie, Auzeville-Tolosane, F-31320 Castanet-Tolosan (FR).		(74) Mandataires: ORES, Irène etc. ; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), BG, BR, CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KP, KR, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), SU, US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: SUBSTANCE WITH LIPO-OLIGOSACCHARIDE STRUCTURE CAPABLE OF ACTING AS PLANT-SPECIFIC SYMBIOTIC SIGNALS, PROCESSES FOR PRODUCING THEM AND THEIR APPLICATIONS		
(54) Titre: SUBSTANCES DE STRUCTURE LIPO-OLIGOSACCHARIDIQUE PROPRES A JOUER LE ROLE DE SIGNAUX SYMBIOTIQUES PLANTES-SPECIFIQUES, LEURS PROCÉDES DE PRODUCTION ET LEURS APPLICATIONS		
<p style="text-align: center;">(I)</p>		
(57) Abstract <p>An essentially pure substance has a structure of a Nod factor or one of its analogues. The Nod factor is characterized by the fact that its biosynthesis is controlled by at least one nodulation gene (<i>nodA, B, C</i>) common to the Rhizobiaceae, in particular to the genera <i>Rhizobium</i>, <i>Bradyrhizobium</i>, <i>Sinorhizobium</i> and <i>Azorhizobium</i>. This substance consists of a lipo-oligosaccharide which is not a derivative of the exopolysaccharides and which has the general formula (I). In formula (I), the Nod factor of which it has the structure is a plant-specific symbiotic signal and is capable of enhancing the capacity of the bacteria to infect the host plant with which it is associated and/or of accelerating the formation of nodules on the host plant with which it is associated and/or of inducing the transcription of symbiotic genes of the Leguminosae. Applications to the treatment of plants and as an active therapeutic agent to humans and animals. G stands for a hexosamine variously substituted, for example by an acetyl group on the nitrogen, a sulphate group, an acetyl group and/or an ether group on oxygen R₁, R₂, R₃, R₅, R₆, R₇, which may be identical or different, stand for H, CH₃CO-, C_XH_YCO- where X is a whole number between 0 and 17 and Y is a whole number between 1 and 35, or any other acyl group, for example a carbamyl group, R₄ stands for a saturated or mono-, di, or tri-unsaturated aliphatic chain containing at least 12 carbon atoms and n is a whole number between 1 and 4.</p>		

(57) Abrégé Substance sensiblement pure présentant la structure d'un facteur Nod ou de l'un de ses analogues, lequel facteur Nod se caractérise par le fait que sa biosynthèse est sous le contrôle d'au moins un gène de nodulation (*nodA,B,C*) commun aux Rhizobiacées, en particulier aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Azorhizobium*. Cette substance est constituée par un lipo-oligosaccharide non dérivé des exopolysaccharides et répond à la formule générale (I). Le facteur Nod dont elle présente la structure est un signal symbiotique plante-spécifique et est apte à amplifier la capacité de la bactérie à infecter la plante-hôte à laquelle il est associé et/ou à accélérer la formation de nodules sur la plante-hôte à laquelle il est associé et/ou à induire la transcription de gènes symbiotiques de Légumineuses. Applications au traitement de plantes et en tant qu'agent thérapeutique actif chez l'Homme et chez l'animal. La formule (I) dans laquelle: G est une hexosamine diversement substituée, par exemple, par un groupe acétyl sur l'azote, un groupe sulfate, un groupe acétyl et/ou un groupe éther sur un oxygène, R₁, R₂, R₃, R₅, R₆, R₇, qui peuvent être identiques ou différents, représentent H, CH₃CO-, C_XH_YCO- où X est un nombre entier compris entre 0 et 17, et Y est un nombre entier compris entre 1 et 35, ou tout autre groupe acyl, tel que par exemple un carbamyl, R₄ représente une chaîne aliphatique saturée ou mono-, di-, ou tri-insaturée comportant au moins 12 atomes de carbone, et n est un nombre entier compris entre 1 et 4.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	ML	Mali
AU	Australie	FR	France	MN	Mongolie
BB	Barbade	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Bésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroon	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MG	Madagascar		
ES	Espagne				

SUBSTANCES DE STRUCTURE LIPO-OLIGOSACCHARIDIQUE PROPRES A JOUER LE ROLE DE SIGNAUX SYMBIOTIQUES PLANTES-SPECIFIQUES, LEURS PROCÉDES DE PRODUCTION ET LEURS APPLICATIONS.

5 La présente Invention est relative à des substances de structure lipo-oligosaccharidique aptes à constituer des signaux symbiotiques plantes-spécifiques, à des procédés de production de ces substances et aux applications de celles-ci.

10 Comme on le sait, les végétaux ont besoin, pour leur croissance d'une source d'azote combiné comme l'ammoniaque ou le nitrate. La fixation de l'azote, par réduction chimique ou biologique de l'azote atmosphérique (N_2) en ammoniaque (NH_3), joue donc un rôle essentiel
15 dans la production agricole.

 Comme on le sait également, des micro-organismes symbiotiques peuvent favoriser la croissance et le développement des plantes par fixation biologique de l'azote.

20 Les Rhizobiacées sont des bactéries du sol Gram-négatives qui fixent généralement l'azote en association symbiotique avec des végétaux : l'établissement d'une telle symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote permet à de nombreuses espèces végétales de
25 croître sur des sols pauvres en azote assimilable. Grâce à la photosynthèse, le partenaire végétal fournit à la bactérie l'énergie nécessaire à la réduction de l'azote moléculaire en ammoniaque. En retour, l'ammoniaque fixé par le microsymbionte est fourni à la plante-hôte qui
30 l'intègre dans son métabolisme azoté. L'association symbiotique qui s'établit entre des bactéries fixatrices d'azote, telles que les Rhizobiacées, et des plantes de la famille des Légumineuses est la plus importante sur le plan écologique et agronomique. Cette association se traduit par la formation de nodosités, ou nodules, essentiellement sur les racines des plantes-hôtes. A
35 l'intérieur de ces nodosités, les bactéries réduisent l'azote atmosphérique en ammoniaque par l'intermédiaire du complexe enzymatique de la nitrogénase.

La symbiose entre les bactéries fixatrices d'azote de la famille des Rhizobiacées (genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, et *Azorhizobium*) et les plantes de la famille des Légumineuses joue donc un rôle très important en agriculture tempérée et tropicale. Parmi ces plantes on citera notamment des oléoprotéagineux comme le soja et l'arachide, des fourrages comme la luzerne et le trèfle, des protéagineux comme le pois et la féverole, des plantes vivrières comme les haricots, pois, lentilles et pois chiches, des engrais verts comme *Sesbania* etc... Grâce à ces symbioses la culture des Légumineuses est souvent moins coûteuse en engrais azotés que la culture des plantes appartenant à d'autres familles. A cet égard, il convient de rappeler que l'utilisation massive des engrais azotés présente un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord la synthèse, le transport et l'épandage des engrais, est coûteuse en énergie fossile, ce qui a plusieurs conséquences : au niveau de l'exploitation agricole elle augmente les coûts de production des agriculteurs et au niveau de l'environnement elle contribue à l'effet de serre par accroissement de la teneur en CO₂. Par ailleurs, une fertilisation azotée non raisonnée ou excessive entraîne une pollution des eaux continentales avec une eutrophisation des eaux de surface et une augmentation de la teneur en nitrates des nappes phréatiques. Ces diverses raisons militent en faveur d'une utilisation accrue de la fixation biologique de l'azote.

Etant donné les conséquences très préjudiciables de l'utilisation excessive d'engrais azotés, il convient donc d'accroître la contribution de la fixation biologique d'azote par les plantes et notamment par les espèces cultivées qui interviennent pour une part importante dans l'alimentation humaine et animale. La solution la plus acceptable, tant du point de vue écologique que

du point de vue économique, est l'amélioration de la symbiose Rhizobiacées-Légumineuses.

Il a été proposé de réaliser cette amélioration par un apport de Rhizobiacées (notamment *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*) au moment du semis, soit par enrobage des graines, soit à l'aide de granulés mélangés aux graines, soit à l'aide d'une culture en milieu liquide. Ces apports bactériens ne sont cependant efficaces que dans les cas, relativement rares, où les bactéries symbiotiques appropriées sont naturellement absentes ou peu abondantes dans les sols. Dans les cas contraires, c'est à dire dans les sols contenant déjà ces bactéries, il est pratiquement impossible d'imposer une souche introduite volontairement, en raison de la compétition avec les bactéries indigènes contenues dans les sols, qui, même si elles ne sont pas forcément efficaces pour la fixation de l'azote, n'en constituent pas moins un facteur limitant pour l'introduction de bactéries sélectionnées.

Il a également été proposé de favoriser la symbiose *Rhizobium*-Légumineuses en traitant les plantes par un exopolysaccharide dérivé de bactéries du genre *Rhizobium* ou par un oligosaccharide contenant un ou plusieurs motifs d'un tel exopolysaccharide (EPS) - cf. la demande internationale PCT publiée sous le N° WO 87/06796 déposée au nom de THE AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY et mentionnant comme Inventeurs : B.G.ROLFE, S.P. DJORDJEVIC, J.W. REDMOND et M. BATLEY -. Toutefois, cet EPS est un produit codé par des gènes non symbiotiques. En effet la biosynthèse de ces exopolysaccharides n'est pas sous le contrôle direct des gènes *nod* qui contrôlent l'infection et la nodulation. Ces exopolysaccharides sont synthétisés par des souches de *Rhizobium* qui ont été guéries de leur plasmide *pSym*, plasmide qui porte l'essentiel des gènes symbiotiques et notamment les gènes *nod*.

Les gènes impliqués dans le processus de formation des nodules ont été localisés et plusieurs gènes de nodulation (gènes *nod*) communs et spécifiques ont été identifiés et caractérisés (voir Long, S. R., Cell, 5 1989, 56, 203-214). Alors que les gènes *nodA, B, C* sont des gènes de nodulation communs aux différentes espèces de Rhizobiacées symbiotiques, il existe des gènes *nod* spécifiques qui déterminent le spectre d'hôte et qui varient, de ce fait, chez les différentes espèces, et des gènes 10 régulateurs, de type *nodD*, qui contrôlent l'expression de l'ensemble des gènes *nod*.

Les gènes communs *nodA, B, C* ont été mis en évidence dans les quatre genres bactériens capables d'établir une symbiose fixatrice d'azote avec les Légumi- 15 neuses : *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, et *Azorhizobium*. Pour le genre *Rhizobium* la séquence nucléotidique de ces gènes a été réalisée chez *R. meliloti* (Török et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12, 9509-9522 ; Jacobs et al., J. Bactériol., 1985, 162, 469-476 ; Egelhoff et al., DNA, 1985, 4, 241-242), *R. leguminosarum* (Rossen et al., Nucl. Acids Res., 1984, 12, 9497-9508), *R. trifolii* (Schofield et al., Nucl. Acids Res., 1986, 14, 2891-2903).

Pour *Bradyrhizobium* sp. (Scott, Nucl. Acids Res., 1986, 14, 2905-2919).

25 Pour *Azorhizobium caulinodans* (Goethals et al., Mol. Gen. Genet., 1989, 219, 289-298).

Une équipe de Chercheurs comprenant plusieurs des Inventeurs de la présente Invention a montré que chez *Rhizobium meliloti*, les gènes communs *nodA, B, C* induisent, 30 conjointement avec les gènes spécifiques *nodH* et *nodQ*, la production de signaux Nod extra-cellulaires hôte-spécifiques, présents dans les surnageants de culture de ces bactéries : cf FAUCHER et al., J. BACTERIOL (1988), 172, 5489-5429 et FAUCHER et al. Molec. Plant-Microbe 35 Interact. (1989), 2, 291-300, entre autres. La seconde de ces deux Publications rend compte, en outre, d'un frac-

tionnement du surnageant stérile par ultrafiltration, qui a permis de mettre en évidence la présence de deux facteurs Nod de masse moléculaire apparente inférieure à 5 000 Da.

5 La spécificité d'infection et de nodulation est déterminée, chez *R.meliloti*, sur deux plans, à savoir : - les gènes *nodD* activent l'expression d'autres opérons *nod* en fonction de la présence de signaux spécifiques produits par les plantes (Gyorgypal et al.,
10 Molec. Gen. Genet., 1988, 212, 85-92) et, - des gènes spécifiques tels que *nodH* et *nodQ*, lorsqu'ils sont activés, déterminent la production de signaux extra-cellulaires bactériens (facteurs Nod), qui permettent la reconnaissance et la stimulation d'une légumineuse-hôte
15 comme la luzerne (Faucher et al., J. Bactériol, 1988, 172, 5489-5499 ; Faucher et al., Molec. Plant-Microbe Interact., 1989, 2, 291-300). Toutefois, la structure chimique des signaux bactériens n'était pas connue.

La présente Invention s'est donné pour but de
20 définir la structure chimique de signaux Nod symbiotiques, et de pourvoir à des substances présentant une telle structure chimique, de pourvoir également à des procédés de production de substances aptes à jouer le rôle de tels signaux Nod symbiotiques et de proposer des
25 applications de ces substances pour le traitement d'organismes appartenant tant au règne végétal qu'au règne animal (y compris l'Homme).

La présente Invention a pour objet une substance sensiblement pure présentant la structure d'un
30 facteur Nod ou de l'un de ses analogues, lequel facteur Nod se caractérise par le fait que sa biosynthèse est sous le contrôle d'au moins un gène de nodulation (*nodA, B, C*) commun aux Rhizobiacées, en particulier aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et
35 *Azorhizobium*, laquelle substance est caractérisée en ce

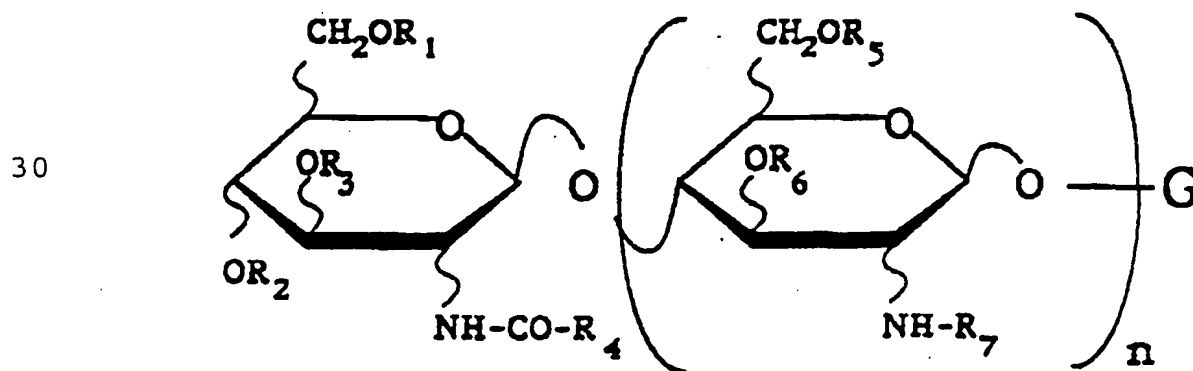
qu'elle est constituée par un lipo-oligosaccharide non dérivé des exopolysaccharides.

On entend par "facteur Nod", au sens de la présente Invention, une molécule-signal produite sous le
 5 contrôle direct de gènes *nod*, qui est un signal grâce auquel les bactéries symbiotiques sont capables d'infecter les plantes et d'induire la formation de nodosités.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite substance sensiblement pure, le facteur Nod, dont
 10 elle présente la structure, est caractérisé en ce qu'il est un signal symbiotique plante-spécifique et est apte à amplifier la capacité de la bactérie à infecter la plante-hôte à laquelle il est associé et/ou à accélérer la formation de nodules sur la plante-hôte à laquelle il
 15 est associé et/ou à induire la transcription de gènes symbiotiques de Légumineuses.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite substance sensiblement pure conforme à l'Invention, le facteur Nod dont elle présente la struc-
 20 ture, a les propriétés structurelles d'un ligand de lectine.

La présente Invention a également pour objet une substance lipo-oligosaccharidique caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale I ci-après :
 25



FORMULE I

dans laquelle :

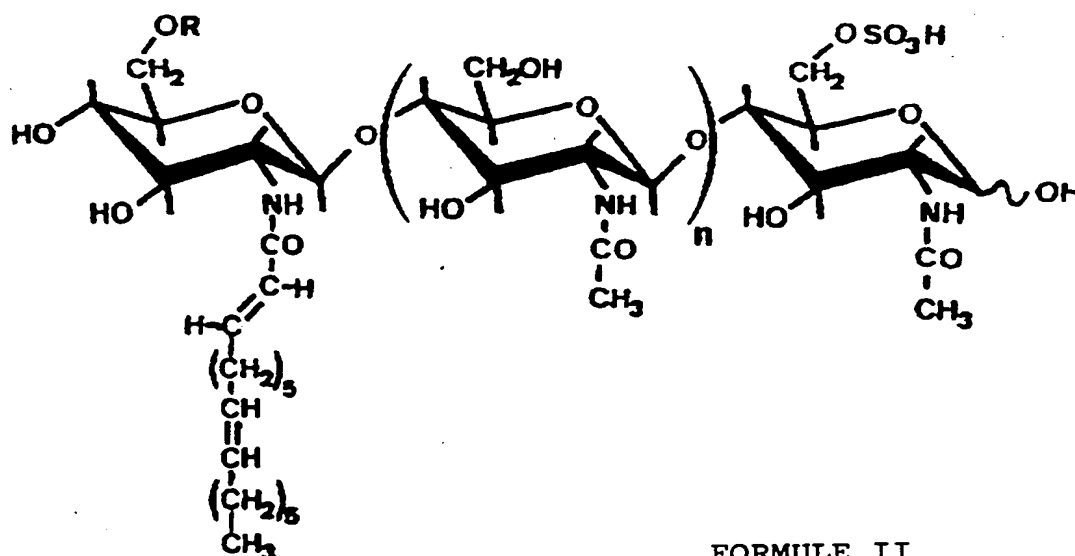
- G est une hexosamine diversement substituée, par exemple, par un groupe acétyl sur l'azote, un groupe sulfate, un groupe acétyl et/ou un groupe éther sur un oxygène,
- $R_1, R_2, R_3, R_5, R_6, R_7$, qui peuvent être identiques ou différents, représentent H, CH_3CO-, C_xH_yCO- où x est un nombre entier compris entre 0 et 17, et y est un nombre entier compris entre 1 et 35, ou tout autre groupe acyl, tel que par exemple un carbamyl
- R_4 représente une chaîne aliphatique saturée ou mono-, di-, ou tri-insaturée comportant au moins 12 atomes de carbone, et
- n est un nombre entier compris entre 1 et 4.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, G représente :

. Chez *R. meliloti* une N-acétyl-D-glucosamine 6-sulfate

. Chez *R. leguminosarum b.v. viciae* une N-acétyl-D-glucosamine.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, le lipo-oligosaccharide conforme à l'Invention est caractérisé en ce qu'il répond à la formule (II) ci-après :



FORMULE II

dans laquelle R représente H ou $\text{CH}_3\text{CO}-$ et n est égal à 2 ou 3.

Les lipo-oligosaccharides de *R. meliloti* répondant à la formule générale (II) dans laquelle
5 R représente H sont désignés ci-après sous le terme général NodRm ; lorsque $n = 2$, le lipo-oligosaccharide correspondant est dénommé NodRm-1 ; lorsque $n = 3$, le lipo-oligosaccharide correspondant est dénommé NodRm-3.

Les lipo-oligosaccharides répondant à la
10 formule générale (II) dans laquelle R représente $\text{CH}_3\text{CO}-$ sont désignés ci-après sous le terme général Ac-NodRm ; lorsque $n = 2$, le lipo-oligosaccharide correspondant est dénommé Ac-NodRm-1 ; lorsque $n = 3$, le lipo-oligosaccharide correspondant est dénommé Ac-NodRm-3.

15 La présente Invention a également pour but de pourvoir à des procédés de production des substances sensiblement pures conformes à la présente Invention, lesquels procédés incluent les procédés de purification à partir de surnageants de culture de Rhizobiacées, les
20 procédés par voie de synthèse séquentielle ou convergente usuels dans les synthèses osidiques et les procédés de production desdites substances par génie génétique, à partir de gènes *nod* clonés dans des microorganismes appartenant ou non à la famille des Rhizobiacées, éventuellement
25 sous le contrôle d'un promoteur approprié et/ou en présence de gènes régulateurs ayant fait l'objet de mutations appropriées.

Selon un mode de réalisation avantageux d'un procédé de production de la substance sensiblement pure
30 conforme à la présente Invention, au cours d'une première étape on produit un plasmide recombinant résultant du clonage dans un plasmide capable de se répliquer dans une bactérie Rhizobiacée ou tout autre bactérie appropriée, (1) soit d'un fragment qui contient des gènes *nod* communs
35 et spécifiques, ainsi que des gènes régulateurs d'une bactérie Rhizobiacée donnée, soit (2) des gènes

régulateurs de l'expression des gènes *nod*. Les bactéries Rhizobiacées ou toutes autres bactéries appropriées sont ensuite modifiées par introduction dudit plasmide recombinant, pour obtenir une souche mutante très surproductrice de facteurs Nod, et on cultive ladite souche mutante dans un milieu de culture approprié ; - au cours d'une deuxième étape, on recueille le surnageant de culture que l'on purifie par extraction par un alcool inférieur approprié, ou par extraction solide-liquide suivie d'une chromatographie HPLC en phase inverse du résidu d'extraction, d'une chromatographie par perméation de gel, d'une chromatographie par échange d'ions et d'une chromatographie HPLC analytique en phase inverse.

Selon un mode de réalisation avantageux de ce procédé, le plasmide surproducteur de facteur Nod est introduit dans une bactérie Rhizobiacée mutante non-productrice d'exopolysaccharides.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de production de la substance sensiblement pure conforme à la présente Invention, on part d'une souche sauvage de bactéries Rhizobiacées fortement productrice de facteurs Nod, que l'on cultive dans un milieu de culture approprié, après quoi l'on recueille le surnageant de culture que l'on traite selon les modalités indiquées plus haut.

La présente Invention a également pour objet un agent de traitement de plantes dont le ou un constituant actif est une substance sensiblement pure telle que définie plus haut, et en particulier :

- un agent de stimulation des mécanismes de défense des plantes contre les pathogènes,
- un agent de stimulation des propriétés symbiotiques des Légumineuses, notamment à l'égard de la fixation d'azote.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'agent de traitement de plantes conforme à la présente

Invention, celui-ci est formulé sous la forme d'une composition d'enrobage de graines ou d'une solution ou suspension aqueuse pour pulvérisation, dans laquelle ladite substance est présente seule ou associée à d'autres constituants actifs.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'agent de traitement de plantes conforme à la présente Invention, ladite substance est présente dans les compositions d'enrobage ou les solutions ou suspensions aqueuses, à une concentration comprise entre 10^{-6} M et 10^{-14} M, lorsque l'agent de traitement de plantes est destiné à être utilisé comme agent de stimulation des mécanismes de défense ou des propriétés symbiotiques.

La présente Invention a en outre pour objet un agent thérapeutique, dont le ou un constituant actif est une substance sensiblement pure telle que définie plus haut.

Selon un mode de réalisation avantageux de cet agent thérapeutique, ladite substance est présente dans l'agent thérapeutique à une concentration comprise entre 10^{-5} M et 10^{-8} M.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère aux exemples qui vont suivre.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples ainsi que les dessins annexés, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLES

Exemple 1 - Préparation des composés conform s à l'Invention par purification à partir d'un milieu de culture de *Rhizobium meliloti*.

5 **A. Production du composé**

La production de facteurs Nod extracellulaires par *Rhizobium* est sous le contrôle d'une part des gènes communs *nodA,B,C* (van Brussel et al., J. Bacteriol., 1986,165,517-522; Zaat et al., J. Bacteriol., 10 1987,169,3388-3391; Faucher et al., J. Bacteriol., 1988,170,5489-5499) et d'autre part des gènes *nod* de spécificité d'hôte, par exemple chez *R.meliloti*, les gènes *nodH* et *nodQ* (Faucher et al., J. Bacteriol., 1988,170,5489-5499 ; Faucher et al., Molec. Plant-Microbe 15 Interact., 1989,2,291-300).

La régulation de la transcription des gènes communs *nodA,B,C* est sous le contrôle de protéines régulatrices codées par les gènes *nodD1*, *nodD2*, *nodD3* et *syrM* (Mulligan et al., PNAS, 1985,82,6609-6613 ; 20 Gyorgypal et al., Mol. Gen. Genet., 1988,212,85-92). La protéine NodD1 n'est active qu'en présence de certains flavonoïdes inducteurs, présents dans les exsudats racinaires de Légumineuses, comme la lutéoline (Mulligan et al., PNAS, 1985,82,6609-6613 ; Peters et al., Science, 25 1986,233,977-980). La présence des gènes *nodD3* et *syrM* sur un plasmide multicopie provoque une activation constitutive des gènes *nodA,B,C* même en l'absence de flavonoïdes inducteurs (Mulligan et al., Genetics, 1989,122,7-18).

30 Pour déterminer la régulation des autres gènes *nod* les Inventeurs ont construit des fusions entre les gènes de spécificité d'hôte *nodE*, *nodG* et *nodH* et le gène *lacZ* d'*E.coli* codant pour la β -galactosidase. Ces fusions ont permis de montrer que chez *R.meliloti* les gènes *nod* 35 de spécificité d'hôte sont régulés de la même façon que les gènes communs *nodA,B,C*: (i) leur transcription est

activée par *nodD1*, *nodD3* et *syrM*, (ii) la lutéoline est nécessaire pour l'activation par *nodD1*, (iii) l'activation de la transcription est beaucoup plus forte quand les gènes régulateurs et les gènes de structure sont sur
5 un plasmide du groupe d'incompatibilité Inc-P1 (présents à 5-10 exemplaires par cellule).

Ces indications ont incité les Inventeurs à choisir un plasmide dérivé du pRK2, le pRK290, dans lequel a été cloné un fragment de 30kb de la région *nod* du
10 mégaplasme *pSym* de *R.meliloti*. Ce plasmide recombinant, le pGMI149 contient l'ensemble des gènes *nod* communs et spécifiques, ainsi que les gènes régulateurs *nodD1*, , *nodD3* et *syrM* (Debellé et al., J. Bacteriol., 1986, 168, 1075-1086 ; Faucher et al., J. Bactériol.,
15 1988, 170, 5489-5499). Ils ont montré que des souches de *R.meliloti* contenant le plasmide pGMI149 sont surproductrices de facteurs *Nod* : en effet, leur production est supérieure d'au moins cent fois par rapport à des souches de *R.meliloti* sauvages.

20 Pour la production à grande échelle des facteurs *Nod*, par exemple pour des cultures en fermenteur, la forte production d'exopolysaccharides peut présenter des inconvénients pour la filtration des cultures et pour la purification des molécules-signal. Les Inventeurs ont
25 donc jugé préférable d'introduire le plasmide surproducteur pGMI149 dans le mutant EJ355 de *R.meliloti* qui ne produit pas d'exopolysaccharides. La souche EJ355 (pGMI149) produit en abondance les facteurs *Nod* mais pas d'exopolysaccharides.

30 En utilisant des fusions de gènes entre les gènes *nod* de *R.meliloti* et le gène *lacZ* d'*Escherichia coli* (fusions *nod::lac*) pour mesurer le niveau d'expression des gènes *nod*, les Inventeurs ont mis au point un milieu de culture qui permet une bonne expres-
35 sion des gènes *nod* et une production élevée de facteurs *Nod*. Un milieu satisfaisant est un milieu minéral qui

contient du succinate comme source de carbone et du glutamate comme source d'azote et de carbone. En effet, dans un milieu riche, contenant des lysats de protéines et des extraits de levures, l'activation de la transcription des gènes *nod* est moins bonne ; en outre la purification des facteurs Nod est plus facile à partir de surnageants de cultures préparés à partir de milieux simples. La composition de ce milieu est, par exemple, la suivante :

- Sels minéraux :

10 KH_2PO_4 14,7 mM ; K_2HPO_4 11,5 mM ; MgSO_4 1 mM ;
 CaCl_2 0,46 mM ; FeCl_3 37 μM ,

- Composés organiques :

L-glutamate de sodium 5,3 mM ; succinate de sodium 7,4 mM ; biotine 2 μM ; lutéoline 10 μM .

15 B.1. Purification du composé

B.1.1. Le composé est extrait du milieu de culture de *Rhizobium meliloti* (15 l) par du butanol (2 extractions de 3 litres de BuOH). La phase butanolique est lavée à l'eau (1 litre) puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans l'eau (500 ml) et extrait 2 fois par l'acétate d'éthyle (2 fois 300 ml). La phase aqueuse est enfin concentrée puis lyophilisée.

B.1.2. Chromatographie HPLC en phase inverse

Le résidu obtenu par extraction butanolique est chromatographié par HPLC en phase inverse sur une colonne μ Bondapak C_{18} , 10 μm - Water Associates -, 7,5X250 mm, avec un débit de 2 ml/mn et en utilisant un gradient linéaire à partir d'un mélange A eau-éthanol, 80-20 jusqu'à l'éthanol pur B (Fig. 1.1) ; la détection est effectuée à 220 nm. La zone présentant une activité biologique est collectée pour purifications complémentaires.

B.1.3. Chromatographie par perméation de gel

La fraction est purifiée par perméation de gel sur colonne Sephadex LH20 (colonne 1x20 cm ; phase LH20 Pharmacia) dans un solvant tel que l'éthanol, à un débit de 4 ml/heure. La détection est effectuée à 220 nm. La

colonne a été préalablement calibrée par rapport à des témoins de polyéthylèneglycols (PEG) (cf. Fig. 1.2). La fraction hachurée active est collectée.

B.1.4. Chromatographie par échange d'ions

- 5 Sur colonne d'échange d'ions (colonne DEAE-Trisacryl 1X2 cm ; IBF), le composé actif (zone hachurée) est élué par un gradient linéaire de NaCl entre 0 et 0,1 N dans un tampon Tris-HCl 5×10^{-3} N, pH=8,2 (Fig. 1.3).

B.1.5. Chromatographie HPLC analytique en phase inverse

- 10 L'ultime étape de purification est une chromatographie HPLC en phase inverse sur colonne analytique (4,5x250 mm ; phase Spherisorb/C₁₈ 5 μ m) avec, comme solvant, un mélange eau-acétonitrile 80-20 à un débit de 1ml/mn ; 300 μ g sont injectés (Fig. 1.4a). Deux pics
15 absorbant à 220 nm sont ainsi détectés et présentent une activité biologique. L'étude structurale montrera qu'il s'agit en fait du même composé apparaissant sous deux formes en équilibre (formes anomériques α et β libres).

B.2. Analyse des constituants

B.2.1. Analyse des monosaccharides

- Après hydrolyse poussée du composé (HCl 3N; 3h; 100°C), puis dérivation en glycoside de méthyle péracétylé, on observe en chromatographie en phase vapeur (CPV) un seul monosaccharide identifié comme étant du déoxy-2-acé-
25 tamido-2 glucose ou de l'acétyl glucosamine (NAc Glc). La série D de ce sucre a été établie après préparation du glycoside peracétate avec un alcool chiral et comparaison en CPV avec des témoins de (-) butanol-2-N-acétyl-glucosamine des séries D et L dérivés de façon analogue.
- 30 La réduction du composé au borodeutereure de sodium ($\text{NaBD}_4/\text{H}_2\text{O}$ 1N; 18h; 20°C) est suivie d'une méthanol-lyse douce (MeOH/HCl 1N; 80°C; 1h) puis d'un partage eau-dichlorométhane. La phase aqueuse contient du GlnAc-1-0-Me et du deoxy-2-acétamido-2-glucitol,
35 identifiés en CPV (Fig. 2.1) ; l'identification en CPV est réalisée sur une colonne OV1 0,32 mmX30m, en utili-

sant l'hélium et un détecteur FID. La phase organique renferme le méthylglycoside de la glucosamine N-acylée par un acide gras C_{16:2} identifiée par son spectre de masse en impact électronique du dérivé pertriméthylsilylé
5 selon les données de la littérature (Demary, M. et al., Nouv. J. Chimie, 1977, 2, 373-378) ; le spectre de masse impact électronique (EI-MS) de la glucosamine 1-OME amidifiée sur l'atome d'azote par un acide gras et pertriméthylsilylée est représenté à la figure 2.3. Après
10 hydrogénation catalytique de la chaîne latérale, méthanolyse (MeOH, HCl 3N; 2h; 100°C), puis acétylation, l'analyse en CPV - réalisée sur colonne OV1 0,32mmX30m à l'aide d'hélium et d'un détecteur FID - des dérivés peracétylés permet de confirmer la structure de ce
15 N-acyl-sucre en visualisant du Glc-NAC-1-OME et du palmitate de méthyle (accompagné de stéarate de méthyle en quantité moindre) (Fig. 2.2).

Cette analyse permet d'établir la présence de trois types de glucosamine: NAcGlc, NacGlc réductrice et
20 N-acyl Glc, selon un cheminement analytique résumé à la Fig. 3 annexée.

B.2.2. Composition en acides gras

Les acides gras présents dans le composé ont pu être isolés après saponification (KOH 5%; 18h; 80°C) puis analysés
25 en CPV - sur colonne OV1 0,32mmX30m à l'aide d'hélium et d'un détecteur FID - sous la forme d'esters de méthyle (Fig. 2.4). Cette étude a permis d'identifier outre un acide gras majoritaire en C_{16:2}, d'autres entités minoritaires: C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0} et C_{18:1}. La position des
30 deux double-liaisons de l'acide gras en C_{16:2} a pu être précisée à partir du spectre de masse MS-MS du carboxylate formé à partir de son ester de perfluorobenzyle (J.C. Promé et al., Rapid Comm. Mass spectrom., 1987, 1, 80-82) et localisée en 2 et 9 sur la chaîne.

B.2.3. Mise en évidence d'une fonction sulfate

Après culture des bactéries en présence de sulfate de sodium marqué au ^{35}S , puis purification du composé, la correspondance observée entre le profil d'absorption UV et
5 l'incorporation de ^{35}S permet de conclure à la présence d'une fonction sulfate dans ce composé. La figure 1.4b représente ladite correspondance obtenue par incorporation de ^{35}S , après culture sur (^{35}S) Na_2SO_4 puis fractionnement selon le profil représenté à la figure
10 1.4a et comptage de la radioactivité par scintillation liquide.

B.2.4. Détermination du mode de liaison interglycosidique

Le mode de liaison entre les différentes glucosamines a été établi après perméthylation du composé réduit par
15 NaBD_4 , hydrolyse et préparation des alditols acétates selon les méthodes précédemment décrites (K. Stellner et al., Arch. Biochem. Biophys., 1973, 155, 464-472), suivies d'une analyse par CPV-SM ; le spectre de masse impact électronique des alditols acétates issus de la
20 perméthylation du composé réduit est représenté à la figure 2.5. Cette étude a permis d'identifier des alditols acétates tetra-méthylés en 1,2,3,5 (spectre a) et 2,3,4,6 (spectre b) et tri-O-méthylés 2,3,6 (spectre c) provenant respectivement d'une glucosamine réductrice
25 substituée en 4 et 6, d'une glucosamine terminale et d'une glucosamine liée en 1 et 4.

B.3. Spectrométrie de masse**B.3.1. Spectrométrie de masse FAB mode positif**

Le spectre de masse FAB mode positif du composé (Fig.
30 4.1, balayage de m/z 4 000 à m/z 100 (masse nominale)) montre un ion pseudomoléculaire $\text{M}+\text{H}^+$ $m/z=1103$, accompagné de l'ion sodé correspondant à $m/z=1125$. Des ions fragmentaires sont aussi observés à $m/z=1023$ et 802 attribués respectivement aux pertes de sulfate et de NAcGlucosamine
35 sulfate. La décomposition de l'ion $m/z=802$ est observée en spectrométrie MS-MS (Fig. 4.2; balayage en B/E) et

conduit à deux fragments glycosilyle à $m/z=599$ et 396 consécutifs aux cassures entre les différents monosaccharides. Ces deux spectres permettent d'établir une structure tétrasaccharidique linéaire dont le sucre réducteur est substitué par une fonction sulfate et le sucre terminal par un acide gras en $C_{16:2}$.

B.3.2. Spectrométrie de masse FAB mode négatif

Hormis l'ion pseudomoléculaire $M-H^-$ à $m/z=1101$, le spectre FAB mode négatif présente des fragments attribuables aux coupures glycosidiques. L'analyse de ces ions conduit à des conclusions structurales analogues à celles décrites plus haut : cf. la figure 4.3 qui montre le spectre de masse d'ionisation FAB négatif, en utilisant le thioglycérol comme matrice.

B.4. RMN

B.4.1. RMN¹H et RMN-2D-homonucléaire proton (COSY)

Les données relatives aux spectres RMN¹H et RMN-COSY permettent d'établir les éléments structuraux suivants :

- a) La chaîne latérale présente en RMN¹H deux types de protons vinyliques correspondant aux deux double-liaisons. Deux signaux à bas champ ($\delta=5,95\text{ppm};1\text{H}$ et $\delta=6,80\text{ppm};1\text{H}$) sont attribués à une double liaison conjuguée à la fonction carbonyle et présentent une grande constante de couplage ($J=15\text{Hz}$) caractéristique d'une géométrie E ; la figure 5.1 représente le spectre RMN¹H susdit ; on utilise comme solvant le CD_3OD et une fréquence de 300MHz (Appareil "Bruker"). Les deux protons de la double-liaison interne à la chaîne, magnétiquement équivalents, apparaissent en un seul signal ($\delta=5,35\text{ppm}$).
- Les protons de ces deux double-liaisons présentent en 2D-COSY une cascade de corrélations avec les autres protons aliphatiques caractéristique d'une chaîne linéaire ; la figure 5.2 représente le spectre RMN-2D-COSY homonucléaire¹H obtenu en utilisant le CD_3OD comme solvant et une fréquence de 300MHz (Appareil "Bruker").

- b) Protons anomériques : Le spectre RMN¹H-2D-COSY homonucléaire de la région saccharidique est représenté à la figure 5.3 ; ce spectre qui a été obtenu en utilisant comme solvant le CD₃OD et une fréquence de 300MHz (Appareil "Bruker") montre dans la région des protons saccharidiques de 3,4 à 5,2 ppm 5 signaux n'ayant qu'une corrélation, attribués aux protons anomériques. De plus, aucun signal n'est masqué par le massif de l'eau comme l'indique l'absence de corrélation de cette région du spectre. Ces signaux anomériques correspondent à trois doublets de liaisons β (δ =4,40 à 4,55ppm; 3H; J=8,5Hz) et deux doublets attribués aux protons anomériques des formes α et β du sucre réducteur ($\delta(\alpha)$ =5,05ppm; J=3,4Hz et $\delta(\beta)$ =4,60ppm; J=8,5Hz).
- c) Protons des cycles : Les cycles saccharidiques sont caractérisés par les signaux méthyle des groupements acétamide, dédoublés par la coexistence des formes α et β libres de l'oligosaccharide (δ =2,0 à 2,15ppm; 6s; 9H). Les autres protons du cycle résonnent entre 3,2 et 3,9 ppm. Seuls trois signaux plus déblindés sont attribués aux hydrogènes situés à proximité du groupement sulfate. Le mode de corrélation observé en 2D-COSY (Fig. 5.3) entre ces trois signaux est caractéristique de protons 5 et 6 (corrélation H5/H6b, H5/H6a et H6a/H6b). Ce résultat permet de situer la fonction sulfate en position 6.

B.4.2. RMN¹³C

- L'attribution des différents signaux du spectre RMN¹³C découplé du proton (Fig. 5.4), a permis de confirmer la présence d'une chaîne d'acide gras di-insaturé, le mode de liaison β 1->4 entre les glucosamines ainsi que la position en 6 du sulfate à partir des éléments suivants ; La figure 5.4 représente le spectre RMN¹³C obtenu à 50,4MHz (Appareil "Bruker"), en utilisant comme solvant le D₂O:

- a) Chaîne d'acide gras : Les déplacements chimiques des carbones de la chaîne latérale (C₂ à C₁₆) sont caracté-

ristiques d'un acide gras possédant une double-liaison conjuguée (C_2 et C_3 ; $\delta=125$ et 155 ppm) et une double liaison interne (C_9 et C_{10} ; $\delta=133$ ppm).

b) Carbones anomériques : Un signal prépondérant (5 $\delta=103,7$ ppm) attribué aux carbones anomériques des monosaccharides non réducteurs, présente un déplacement chimique analogue au C_1 du glucopyranoside de méthyle du GlcNAc. Deux signaux d'intensités plus faibles sont attribués au C_1 de la glucosamine réductrice apparaissant 10 sous ces deux formes anomériques libres ($\delta C_{1\alpha}=93,1$ ppm et $\delta C_{1\beta}=97,8$ ppm).

c) Cycle : A partir des données de la littérature, l'attribution des différents signaux conduit à confirmer l'enchaînement β 1- \rightarrow 4 dans le tétrasaccharide. Cette 15 attribution est compliquée par la séparation en deux groupes de signaux des carbones de la glucosamine réductrice. La présence de la fonction sulfate en 6 est confortée par le déblindage observé du carbone 6 porteur de cette fonction ($\delta C_{6-1}=68,7$ ppm).

20 **Exemple 2 - Mise en évidence de l'activité biologique du facteur NodRm-1**

Les activités biologiques mises en évidence (i) par le test d'activité spécifique de déformation des poils racinaires (Had) sur la vesce décrit par Zaat et 25 al., (J. Bactériol., 1987, 169, 3388-3391), (ii) et par les tests de déformation et de ramification des poils racinaires de luzerne décrits par Faucher et al. (J. Bactériol., 1988, 170, 5489-5499 ; Molec. Plant-Microbe Interact., 1989, 2, 291-300) ont prouvé que la substance 30 conforme à l'Invention est un signal symbiotique plante-spécifique dont la production est sous le contrôle des gènes *nod*.

En effet :

1) après trois types de purifications basés 35 sur des propriétés physico-chimiques différentes, échange d'ions, filtration en gel et la chromatographie en phase

inverse, on observe dans tous les cas une corrélation absolue entre la présence de cette molécule - caractérisée par son profil HPLC, par spectrométrie de masse et par spectrométrie RNM-¹H- et son activité Had
5 spécifique sur la luzerne ;

2) une augmentation de l'activité des gènes *nod* soit par induction de la transcription, soit par l'augmentation du nombre de copies de ces gènes, est corrélée avec une augmentation de la production de la
10 molécule, alors qu'une mutation due au transposon Tn5 dans les gènes *nodA* ou *nodC* a pour effet de supprimer sa production ;

3) L'activité biologique du composé NodRm-1, telle que détectée par les bio-essais de ramification des
15 poils racinaires est très élevée et spécifique.

Une solution NodRm-1 à une concentration de l'ordre de 10^{-8} - 10^{-10} M provoque des réactions Had sur la luzerne, hôte homologue, mais pas sur la vesce, qui est un hôte hétérologue. Le composé NodRm-1 (voir formule II)
20 est encore actif vis-à-vis de la luzerne, à une concentration de 10^{-11} M.

Le spectre RNM¹H indique pour le composé NodRm-1 une pureté d'au moins 95 % (cf. Fig. 5.1).

Il n'a pas été détecté, dans la fraction
25 active, de molécules comportant un noyau aromatique caractéristique des hormones végétales telles que l'auxine et la cytokinine. C'est pourquoi les contaminants hormonaux éventuels devraient être présents à des concentrations inférieures à 10^{-12} M, c'est-à-dire
30 à des concentrations environ 100 000 fois inférieures au seuil (10^{-7} M) auquel ces phythormones agissent lorsqu'elles sont ajoutées par voie exogène, ce qui signifie que l'on ne peut pas attribuer à de tels contaminants les effets observés.

35 L'étude des mutants de *R.meliloti* affectés dans des gènes hôtes-spécifiques fait apparaître une

corrélation absolue entre la spécificité du comportement symbiotique de cellules vivantes de *Rhizobium* et la spécificité du bio-essai Had de leurs surnageants stériles, ce qui indique que les signaux Nod sont
5 impliqués dans l'induction de l'infection spécifique et de la nodulation.

Le composé NodRm-1 a à la fois une très forte activité biologique et une très forte spécificité. En effet, il provoque des réactions détectables sur la
10 plante-hôte à des concentrations très faibles, de l'ordre de 10^{-12} M, alors que les hormones végétales connues, comme les auxines et cytokinines, agissent à des concentrations nettement supérieures (10^{-7} - 10^{-8} M). D'autre part, les oligosaccharides de type "éliciteurs" qui ont
15 été décrits dans l'Art Antérieur et qui agissent à des concentrations faibles (10^{-9} M) ne sont pas spécifiques, alors que la molécule-signal NodRm-1 conforme à l'Invention a une grande spécificité d'action : alors qu'elle agit à une concentration de 10^{-12} M sur la
20 luzerne, plante homologue, elle n'est toujours pas active à une concentration de 10^{-8} M sur une plante non-hôte comme la vesce. Cette molécule présente donc des propriétés originales et importantes quant à son activité sur les plantes.

25 En l'absence de bactéries et à de faible concentrations (10^{-7} M- 10^{-9} M) la molécule-signal NodRm-1 provoque l'induction d'abondantes divisions mitotiques dans le cortex racinaire de la luzerne : NodRm-1 présente donc un fort effet mitogène.

30 En l'absence de bactéries et à de faible concentrations (10^{-7} M- 10^{-9} M) la molécule-signal NodRm-1 provoque l'induction de la formation de nodosités sur les racines de la luzerne, nodosités qui présentent des caractéristiques ontologiques, morphologiques et
35 anatomiques des nodosités de luzerne induites par les

bactéries symbiotiques. NodRm-1 a donc un effet organogène sur les racines de luzerne.

En l'absence de bactéries et à de très faibles concentrations (10^{-9} M 10^{-12} M), le composé NodRm-1
5 provoque des déformations de poils absorbants sur la luzerne et une induction de la transcription de gènes symbiotiques de Légumineuses. A ces mêmes doses en présence de *R.meliloti*, l'addition de composé NodRm-1 provoque une accélération de l'infection et de la
10 formation des nodosités racinaires. Son addition à des Légumineuses, par exemple par enrobage de graines au moment du semis, est apte à accélérer la formation des nodosités et l'établissement de la fixation d'azote.

Il est important de souligner que c'est la
15 première fois qu'on isole à partir d'une bactérie des oligomères d'hexosamines sulfatés. En effet, des sucres sulfatés ont été isolés chez l'animal mais n'avaient été ni détectés ni a fortiori isolés jusqu'à ce jour ni chez les plantes ni chez les bactéries.

20 De plus, les oligomères d'hexosamines sulfatés et acylés conformes à la présente Invention présentent une activité biologique exceptionnelle en ce qu'ils ont une activité à des doses infinitésimales ; en effet, ils sont au moins 100 000 fois plus actifs que les hormones
25 végétales. On n'a jamais proposé jusqu'à présent l'utilisation de substances naturelles ayant une telle activité à des doses aussi faibles, dans le domaine végétal. Cette activité exceptionnelle laisse à penser que les substances conformes à l'Invention ont une affi-
30 nité considérable pour certains récepteurs - affinité très supérieure à celle des produits décrits jusqu'à présent y compris les hormones végétales -. Les récepteurs qui ont une affinité pour les sucres présentent générale-
35 ment la structure de glycoprotéines et notamment de lectines ; or de tels récepteurs existent aussi dans le règne animal ; les substances conformes à l'Invention

doivent donc être considérées comme pouvant être dotées d'une activité thérapeutique importante. En particulier, l'agent thérapeutique conforme à l'Invention est propre, entre autres, à stimuler les mécanismes de défense contre les pathogènes chez l'Homme et chez l'animal.

Exemple 3 - Préparation des substances Ac-NodRm-1 et Ac-NodRM-3 par purification à partir d'un milieu de culture de *Rhizobium meliloti*

A. Production des composés

Si au lieu d'introduire le plasmide "surproducteur" pGM1149 dans la souche de *R. meliloti* 2011, on introduit le plasmide pMH682 qui contient seulement le couple de gènes régulateurs *syrm/NodD3*, on provoque également une forte augmentation de la transcription des gènes *nod* communs et spécifiques et une augmentation de la production de facteurs Nod. Les extraits butanoliques du surnageant d'une telle souche, lorsqu'ils sont fractionnés par chromatographie HPLC, présentent un profil différent de celui des extraits de la souche *R. meliloti* 2011 (pGM1149), ce qui implique la production de nouveaux composés.

B. Détermination de la structure des composés

1. Purification

Les composés sont purifiés selon le protocole décrit dans l'exemple 1. L'ultime étape de chromatographie HPLC analytique en phase inverse permet de séparer le composé Ac-NodRm-1 du composé Ac-NodRM-3.

2. Etudes structurales

2.1. Structure du composé AC-NodRm-1

2.1.1. Traitement au méthanolate de sodium

Par traitement au méthanolate de sodium, le composé Ac-NodRm-1 est converti en NodRm-1 dont la structure est déterminée comme dans l'exemple 1.

2.1.2. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse FAB mode positif du composé Ac-NodRm-1 (Fig 6A) montre un ion moléculaire

protonné à m/z 1145, ainsi que les ions $(M+Na)^+$ à m/z 1167 et $(M+2Na-H)^+$ à m/z = 1189. La décomposition de l'ion moléculaire protonné par spectrométrie MS/MS (Fig. 6B : balayage B/E) conduit à des ions fragmentaires à m/z 1065, m/z 844, m/z 641 et m/z 438. Les ions fragments à m/z 1065 et m/z 844 sont attribués respectivement à la perte de SO_3 et de N-acétyl-D-glucosamine sulfate. Les fragments à m/z 641 et m/z 438 correspondent aux ions glycosylium obtenus par rupture des liaisons interglycosidiques. Ces deux spectres montrent que le composé Ac-NodRm-1 ne diffère du composé NodRm-1 que par la présence d'un groupement acétate sur la glucosamine terminale non réductrice.

2.1.3. RMN^1H

Le spectre RMN^1H du composé Ac-NodRm-1 permet d'établir les éléments structuraux décrits dans l'exemple 1 (paragraphe B.4.1.) pour le composé NodRm-1.

- (i) deux doubles liaisons dont une conjuguée de géométrie E ;
- (ii) signaux anomériques caractéristiques de liaison β
- (iii) signaux caractéristiques d'un groupe sulfate en position 6.

De plus, deux signaux à δ = 4,16 ppm et δ = 4,46 ppm, absents dans le spectre du composé NodRm-1 et disparaissant après O-déacétylation, permettent de localiser le groupement acétate en position 6 du sucre terminal non réducteur

2.2. Structure du composé Ac-NodRm-3

La structure du composé Ac-NodRm-3 a été établie par spectrométrie de masse FAB mode positif (Fig.). On observe un ion moléculaire protonné à m/z = 1348 ainsi que des ions sodés $(M+Na)^+$ à m/z = 1370 et $(M+2Na-H)^+$ à m/z = 1392. Les ions à m/z = 1268 et m/z = 1047 sont attribués respectivement à la perte de SO_3 et d'une N-acétyl-glucosamine sulfate à partir de $(M+H)^+$. Les ions à m/z = 844, m/z = 641 et m/z = 438 sont

attribués aux ions glycosylium obtenus par coupures interglycosidiques. Ce spectre indique qu'Ac-NodRm-3 :

(i) est constitué d'un enchaînement linéaire de cinq dérivés de D-glucosamine ;

5 (ii) possède une chaîne N-acyl diinsaturée de 16 carbones et un groupement O-acétate sur le résidu glucosamine terminal non réducteur ;

(iii) possède une fonction sulfate sur le résidu N-acétyl-D-glucosamine réducteur.

10 L'incubation du composé Ac-NodRm-3 en présence d'une exochitinase (extraite de *Streptococcus griseus*, Sigma) libère notamment un dimère de N-acétyl-D-glucosamine et de N-acyl-O-acétyl-D-glucosamine, ce qui montre que les liaisons entre les trois premiers résidus
15 N-acétyl-D-glucosamine sont de type β -1,4. La digestion d'Ac-NodRm-3 par une endochitinase (également extraite de *Streptococcus griseus*, Boeringer) conduit à la formation d'une N-acyl-O-acétyl-D-glucosamine montrant que la liaison avec le résidu terminal non réducteur est
20 également de type β -1,4.

Exemple 4 - Préparation de facteurs Nod à partir d'un milieu de culture de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*

A. Production des facteurs Nod

25 Dans les pays européens la culture de protéagineux, comme le Pois et le Féverole, s'est beaucoup développée au cours de la dernière décennie. Les Inventeurs ont donc entrepris d'étudier la production de facteur Nod par *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciae*, la
30 bactérie symbiotique de ces protéagineux.

Dans le but de provoquer une augmentation de la production de ces signaux, les Inventeurs ont introduit dans la souche *R. leguminosarum* 248, le plasmide pIJ1089. Ce plasmide, dérivé du vecteur pLAFR1,
35 contient l'ensemble de la région Nod de *R. leguminosarum*,

c'est-à-dire les opérons *nodD*, *nodABCIJ*, *nodFEL*, *nodMNT*, *nodO* (Downie et al., EMBO J., 1983, 2, 947-952).

La souche 248(plJ1089) est cultivée dans le même milieu que *R. meliloti*, mais pour l'induction de la transcription des gènes *nod*, une flavanone, la naringénine, a été utilisée à la place de la lutéoline. Après induction des gènes *nod* le surnageant des cultures présente une forte activité de déformation de poils absorbants d'une espèce de vesce appropriée (*Vicia sativa* subsp. *nigra*). Cette activité n'est pas détectable dans les surnageants de culture d'une souche *R. leguminosarum* 248 mutée dans les gènes communs *nodABC*.

B. Purification

Les composés Nod sont extraits du milieu de culture selon le procédé décrit dans l'exemple 1 (B.1.1.). L'extrait est lyophilisé puis chromatographié en HPLC phase inverse selon le procédé décrit dans l'exemple 1 (B.1.2.). Les composés Nod sont ensuite purifiés sur une cartouche Sep-Pak QMA (Waters Millipore) forme acétate. Les composés sont élués avec 5 ml d'éthanol absolu.

C. Détermination de la structure

Le spectre de masse FAB en mode positif montre majoritairement trois ions moléculaires protonnés à $m/z = 1067$, $m/z = 1069$ et $m/z = 1095$, accompagnés de leurs ions sodés $(M+Na)^+$ respectivement à $m/z = 1089$, $m/z = 1091$ et $m/z = 1117$. La décomposition par spectrométrie MS/MS de l'ion à $m/z = 1089$ (respectivement $m/z = 1091$ et $m/z = 1117$) fournit des ions fragments à $m/z = 868$ (respectivement $m/z = 870$ et $m/z = 896$), $m/z = 665$ (respectivement $m/z = 667$ et $m/z = 693$) et $m/z = 462$ (respectivement $m/z = 464$ et $m/z = 490$). Ces ions sont obtenus par rupture interglycosidique, avec perte successive de fragments d'une masse de 203 correspondant à un résidu N-acétyl-glucosamine. Ces spectres montrent que les composés NodR1 sont constitués

d'un enchainement linéaire de N-acétyl-hexosamine. Les ions de $m/z = 462$, 464 et 490 correspondent à des O-acétyl-hexosamines diversement N-acylées.

L'analyse des acides gras portés par le résidu terminal non-réducteur a été réalisée par GC/MS après saponification selon le protocole décrit dans le paragraphe B.2.2. Cette étude a permis d'identifier les acides gras majoritaires suivants : $C_{16:0}$, $C_{15:1}$ et $C_{18:1}$

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'Invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente Invention.

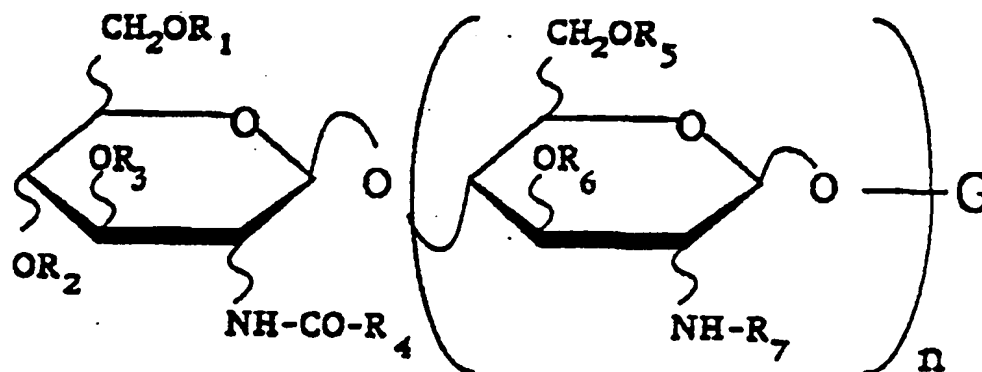
REVENDICATIONS

1° Substance sensiblement pure présentant la structure d'un facteur Nod ou de l'un de ses analogues, lequel facteur Nod se caractérise par le fait que sa biosynthèse est sous le contrôle d'au moins un gène de nodulation (*nodA,B,C*) commun aux Rhizobiacées, en particulier aux genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* et *Azorhizobium*, laquelle substance est caractérisée en ce qu'elle est constituée par un lipo-oligosaccharide non dérivé des exopolysaccharides.

2° Substance sensiblement pure selon la Revendication 1, caractérisée en ce que le facteur Nod dont elle présente la structure est un signal symbiotique plante-spécifique et est apte à amplifier la capacité de la bactérie à infecter la plante-hôte à laquelle il est associé et/ou à accélérer la formation de nodules sur la plante-hôte à laquelle il est associé et/ou à induire la transcription de gènes symbiotiques de Légumineuses.

3° Substance sensiblement pure selon la Revendication 1 ou la Revendication 2, caractérisée en ce que le facteur Nod dont elle présente la structure, a les propriétés structurales d'un ligand de lectine.

4° Substance lipo-oligosaccharidique caractérisée en ce qu'elle répond à la formule générale I ci-après :



FORMULE I

dans laquelle :

- G est une hexosamine diversement substituée, par exemple, par un groupe acétyl sur l'azote, un groupe sulfate, un groupe acétyl et/ou un groupe éther sur un

5 oxygène.

- R1, R2, R3, R5, R6, R7, qui peuvent être identiques ou différents, représentent H, CH₃CO-, CXHYCO- où x est, un nombre entier compris entre 0 et 17 et y est un nombre

10 entier compris entre 1 et 35, ou tout autre groupe acyl,

- R4 représente une chaîne aliphatique saturée ou mono-, di-, ou tri-insaturée comportant au moins 12 atomes de carbone, et

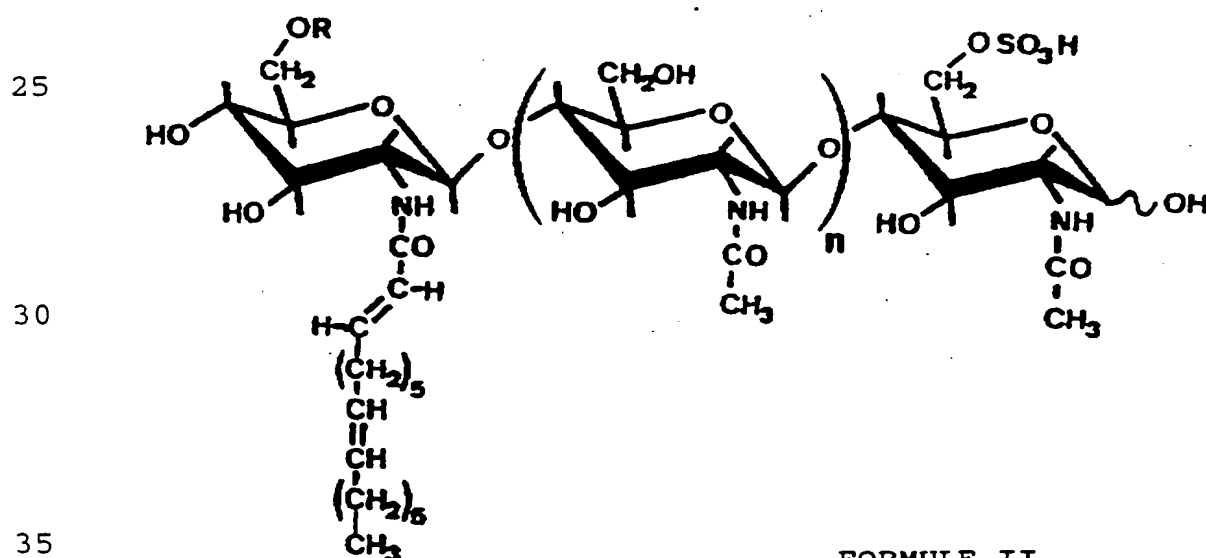
- n est un nombre entier compris entre 1 et 4.

15 5' Oligosaccharide selon la Revendication 4, caractérisé en ce que, G représente :

. Chez *R. meliloti* une N-acétyl-D-glucosamine 6-sulfate

. Chez *R. leguminosarum b.v. viciae* une N-acétyl-D-glucosamine

20 6' Oligosaccharide selon l'une quelconque des Révendications 4 ou 5, caractérisé en ce qu'il répond à la formule (II) ci-après :



FORMULE II

dans laquelle R représente H ou $\text{CH}_3\text{CO}-$ et n est égal à 2 ou 3.

7° Procédé de préparation de substances selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe qui comprend les procédés de purification à partir de surnageants de culture de Rhizobiacées, les procédés par voie de synthèse séquentielle ou convergente usuels dans les synthèses osidiques et les procédés de production desdites substances par génie génétique, à partir de gènes *nod* clonés dans des microorganismes appartenant ou non à la famille des Rhizobiacées, éventuellement sous le contrôle d'un promoteur approprié et/ou en présence de gènes régulateurs ayant fait l'objet de mutations appropriées.

8° Procédé de production d'une substance selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, par purification, caractérisé en ce qu'au cours d'une première étape on produit un plasmide recombinant résultant du clonage dans un plasmide capable de se répliquer dans une bactérie Rhizobiacée ou toute autre bactérie appropriée, (1) soit d'un fragment qui contient des gènes *nod* communs et spécifiques ainsi que les gènes régulateurs d'une bactérie Rhizobiacée donnée, soit (2) des gènes régulateurs de l'expression des gènes *nod*, les bactéries Rhizobiacées ou toute autre bactérie appropriée sont ensuite modifiées par introduction dudit plasmide recombinant, pour obtenir une souche mutante très surproductrice de facteurs Nod, et on cultive ladite souche mutante dans un milieu de culture approprié ; - au cours d'une deuxième étape on recueille le surnageant de culture, que l'on purifie par extraction par un alcool inférieur approprié, ou par extraction solide-liquide appropriée, suivie d'une chromatographie HPLC en phase inverse du résidu d'extraction, d'une chromatographie par perméation de gel, d'une chromatographie par échange d'ions et d'une chromatographie HPLC analytique en phase inverse.

9' Procédé selon la Revendication 8, caractérisé en ce que le plasmide surproducteur de facteur Nod est introduit dans une bactérie Rhizobiacée mutante non-productrice d'exopolysaccharides.

5 10' Procédé de production de substances selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on part d'une souche sauvage de bactéries Rhizobiacées fortement productrice de facteurs Nod, que l'on cultive dans un milieu de culture approprié, après
10 quoi l'on recueille le surnageant de culture que l'on purifie conformément à la 2ème étape du procédé selon la Revendication 8.

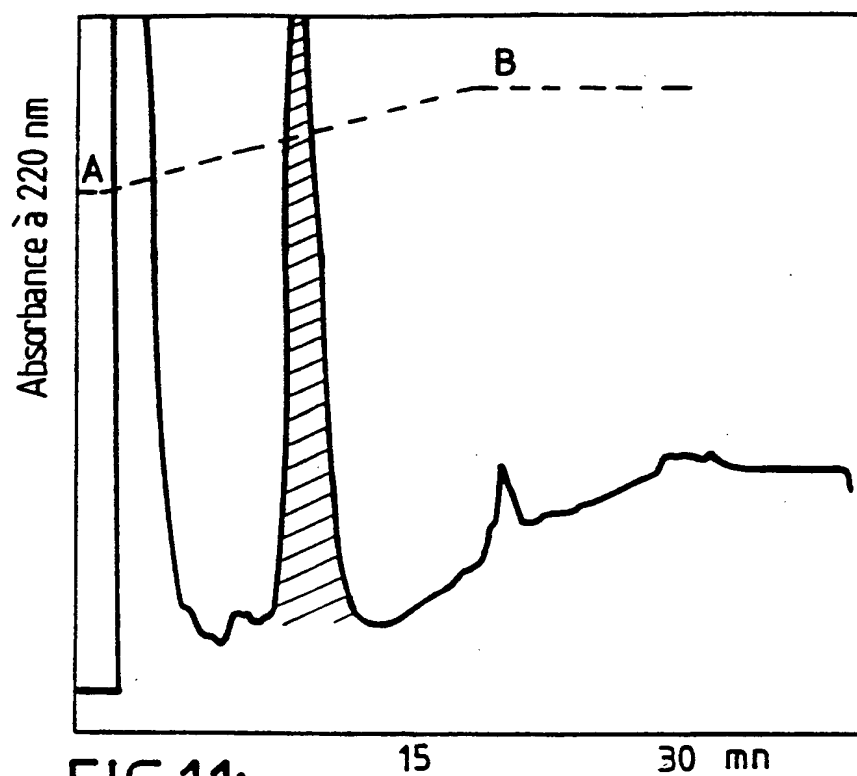
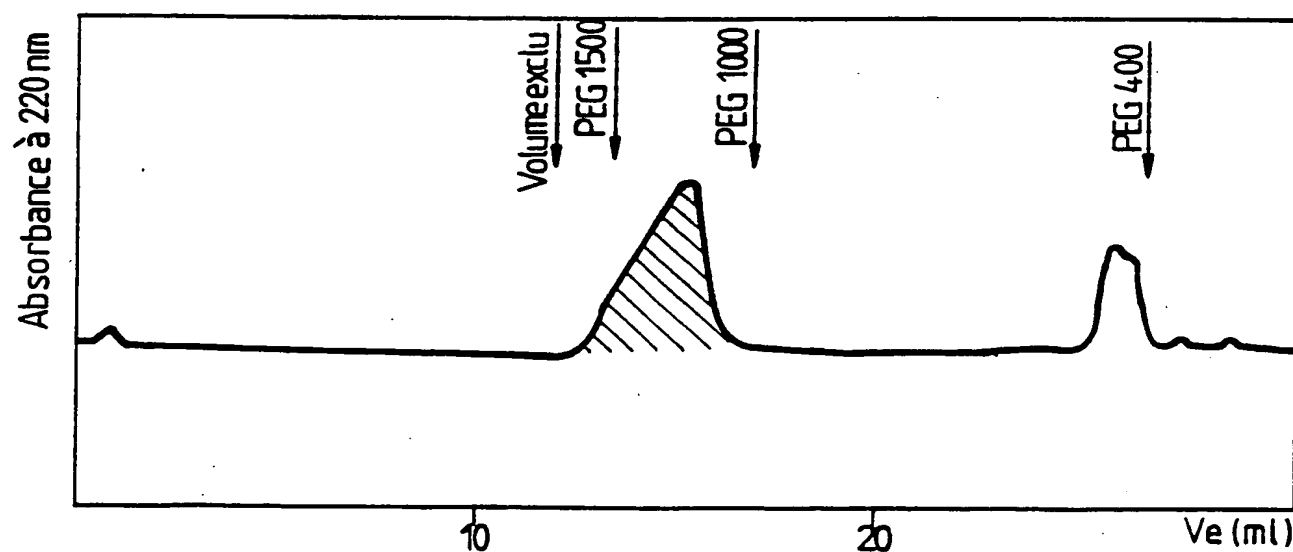
11' Agent de traitement de plantes caractérisé en ce que son ou un constituant actif est une substance
15 selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6.

12' Agent de traitement de plantes selon la Revendication 11, caractérisé en ce que son ou un constituant actif est présent à une concentration comprise entre 10^{-6} M et 10^{-14} M.

20 13' Agent thérapeutique actif chez l'Homme et chez l'animal, caractérisé en ce que son ou un constituant actif est une substance selon l'une quelconque des Revendications 1 à 6.

14' Agent thérapeutique selon la Revendication
25 13, caractérisé en ce qu'il est présent dans une composition à une concentration comprise entre 10^{-5} M et 10^{-8} M.

1/16

FIG.1.1:FIG.1.2

2/16

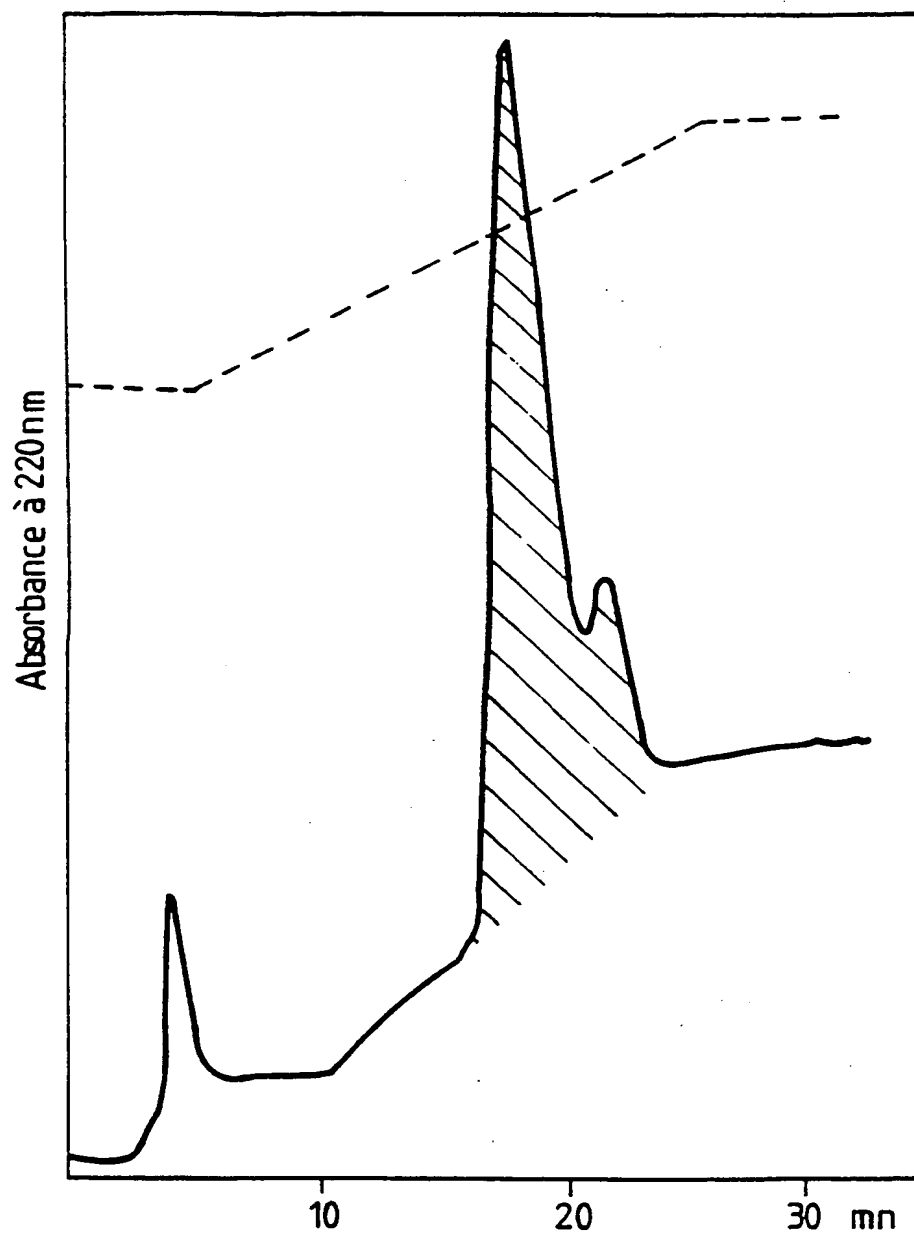
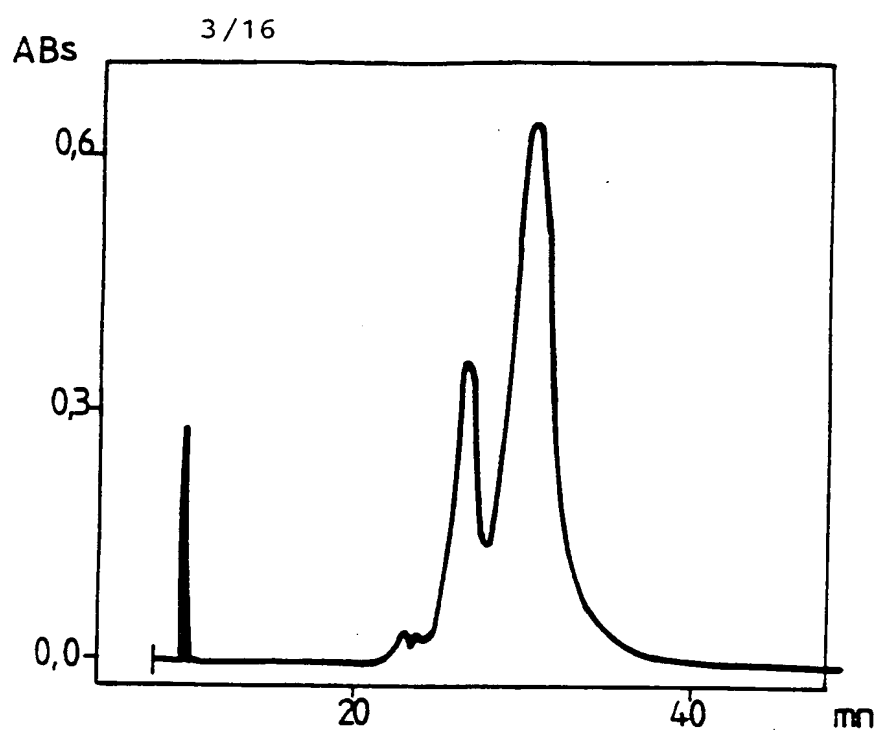
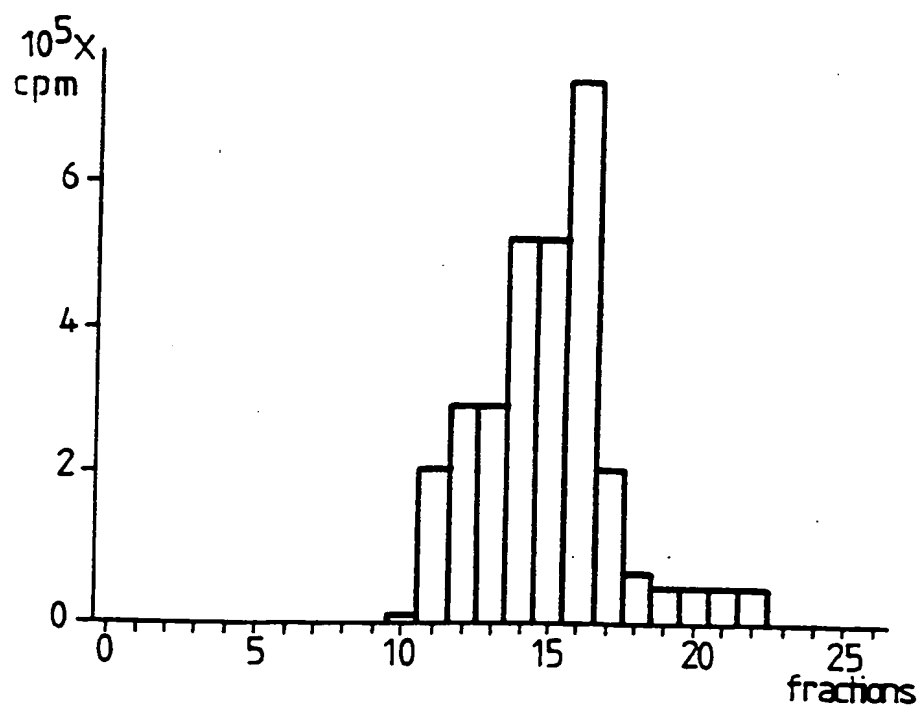
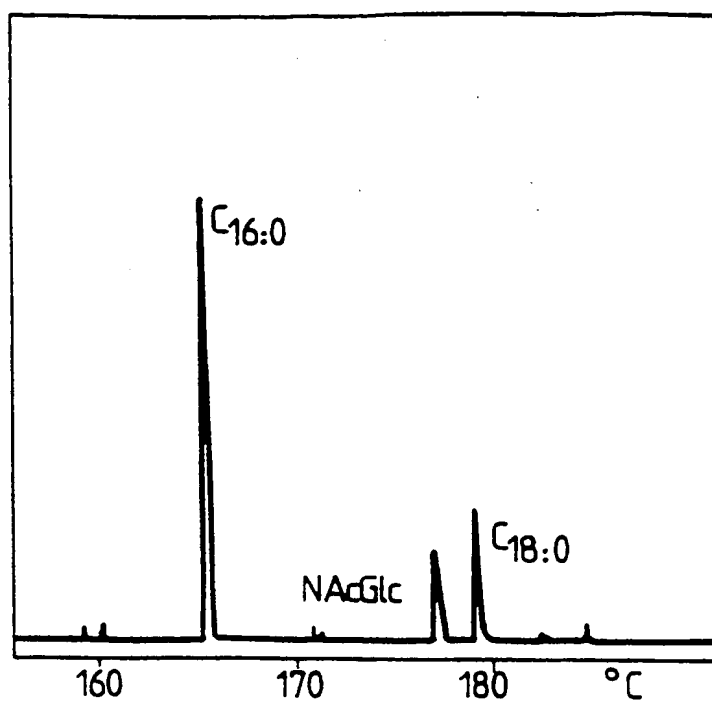
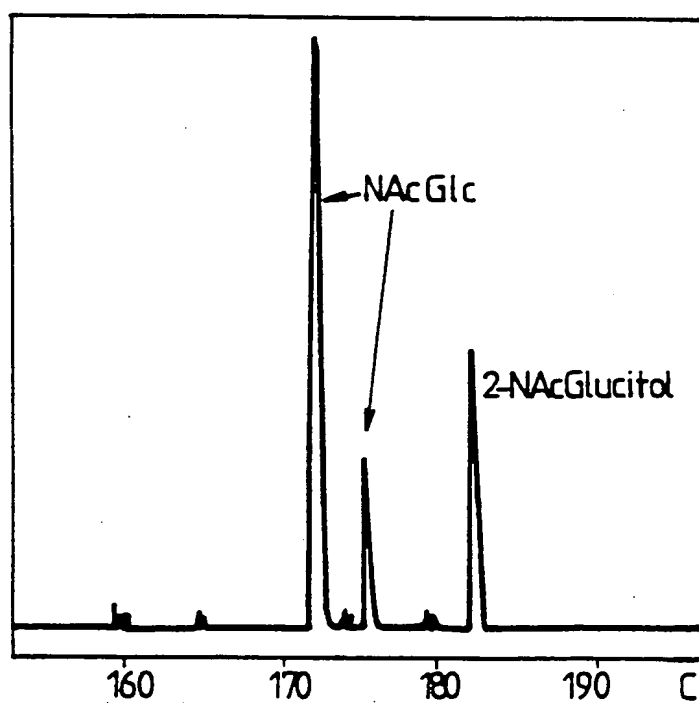
FIG.1.3

FIG.1.4aFIG.1.4b

4/16

FIG.2.2FIG.2.1

5 / 16

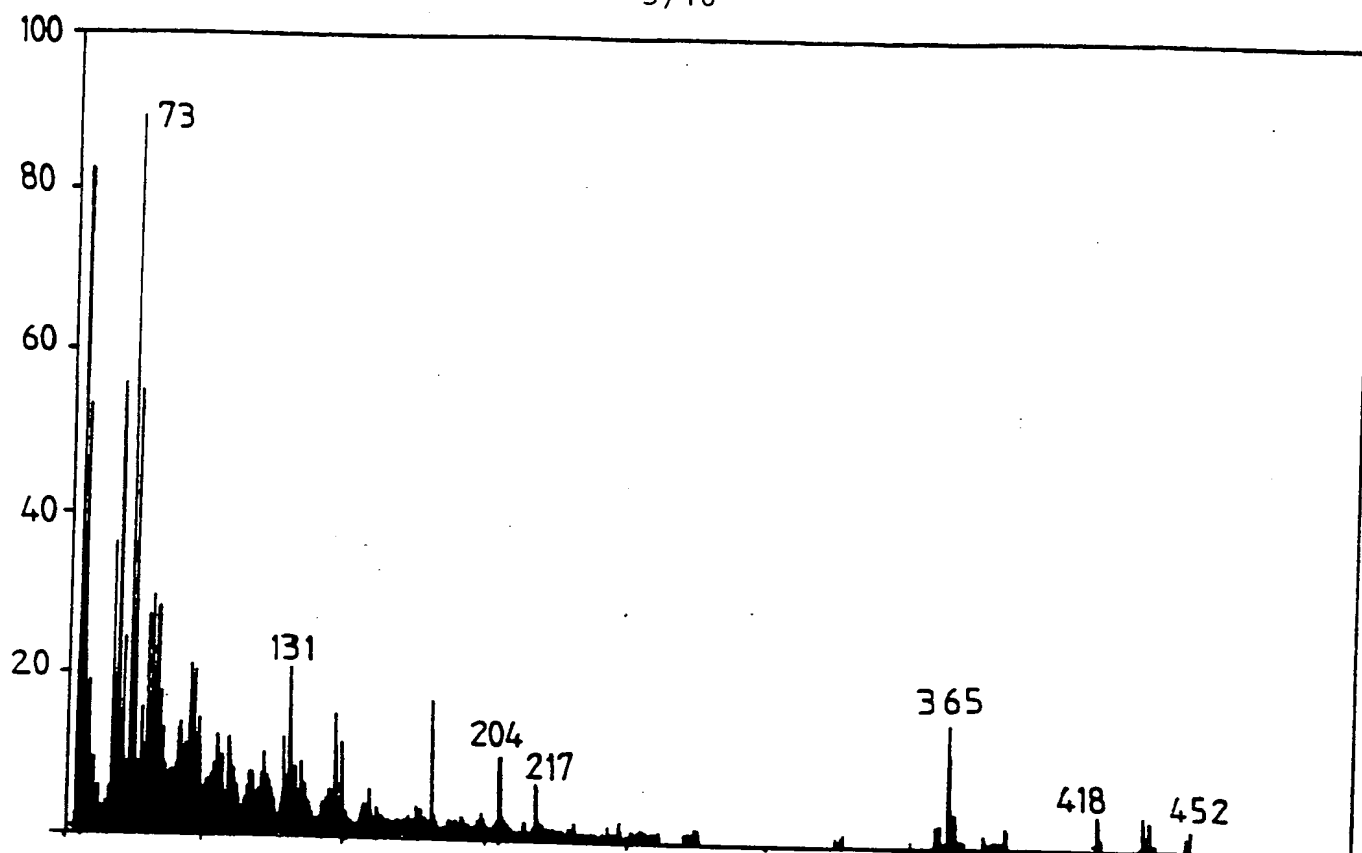
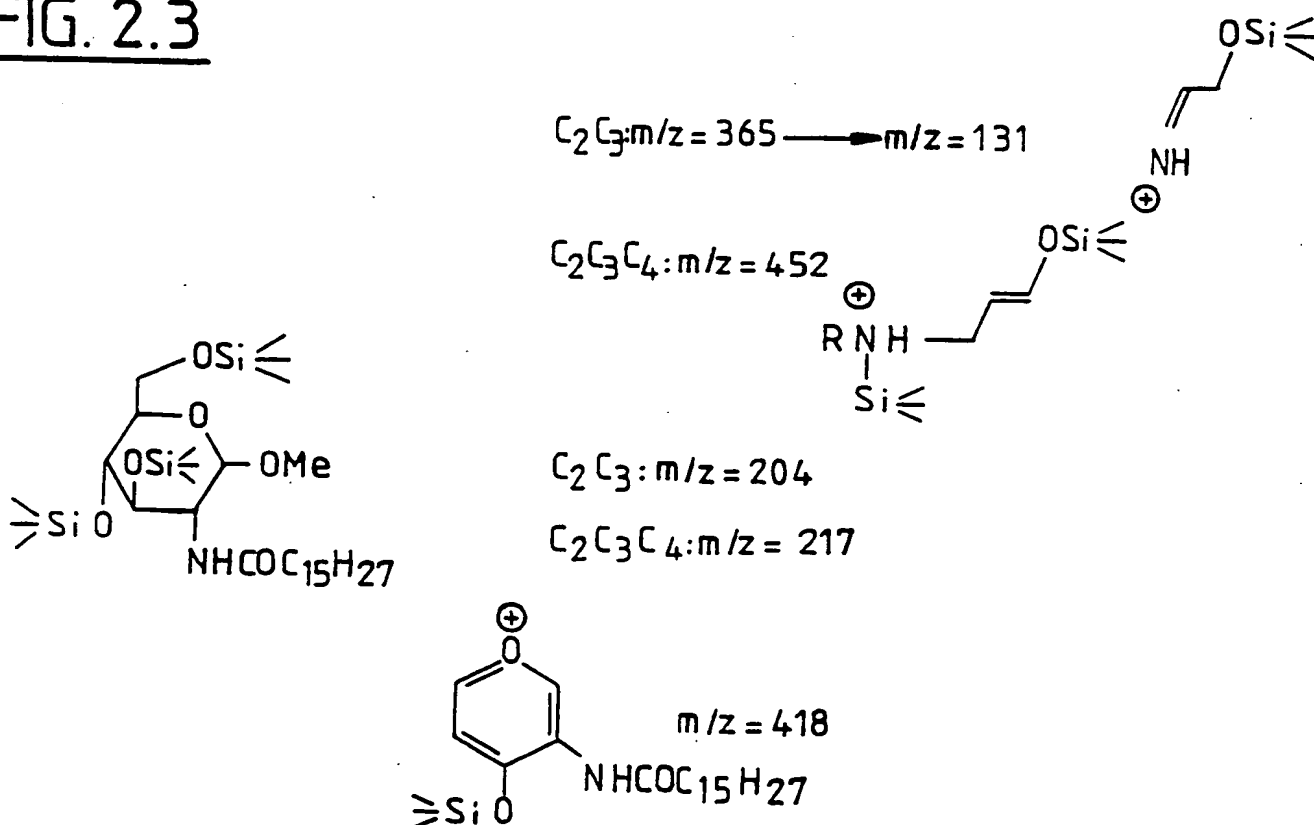
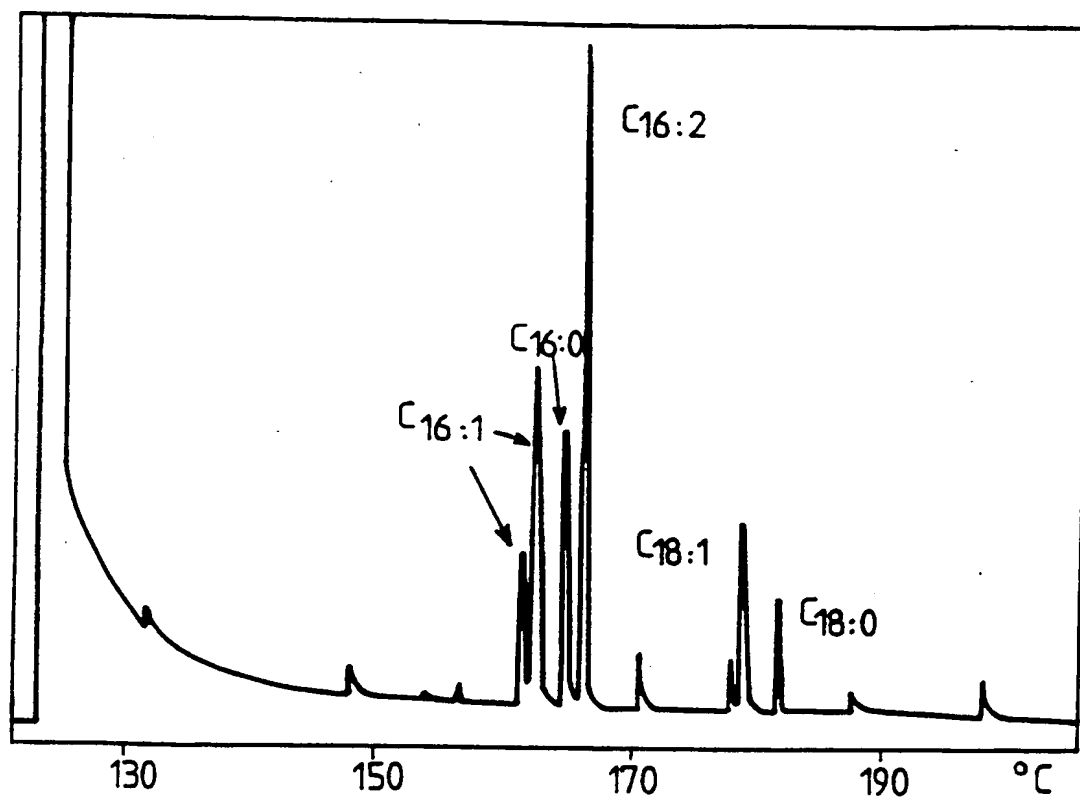
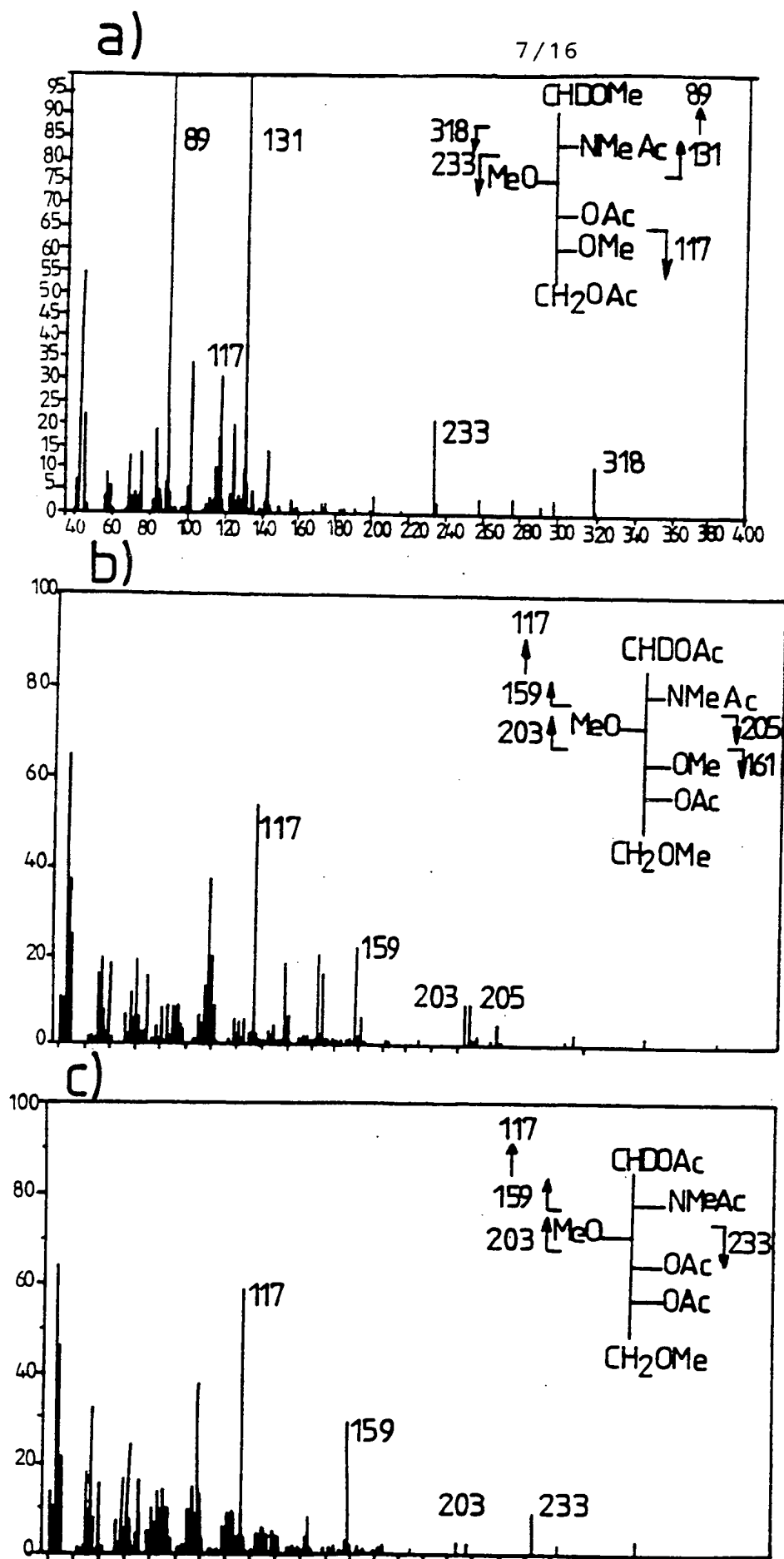


FIG. 2.3

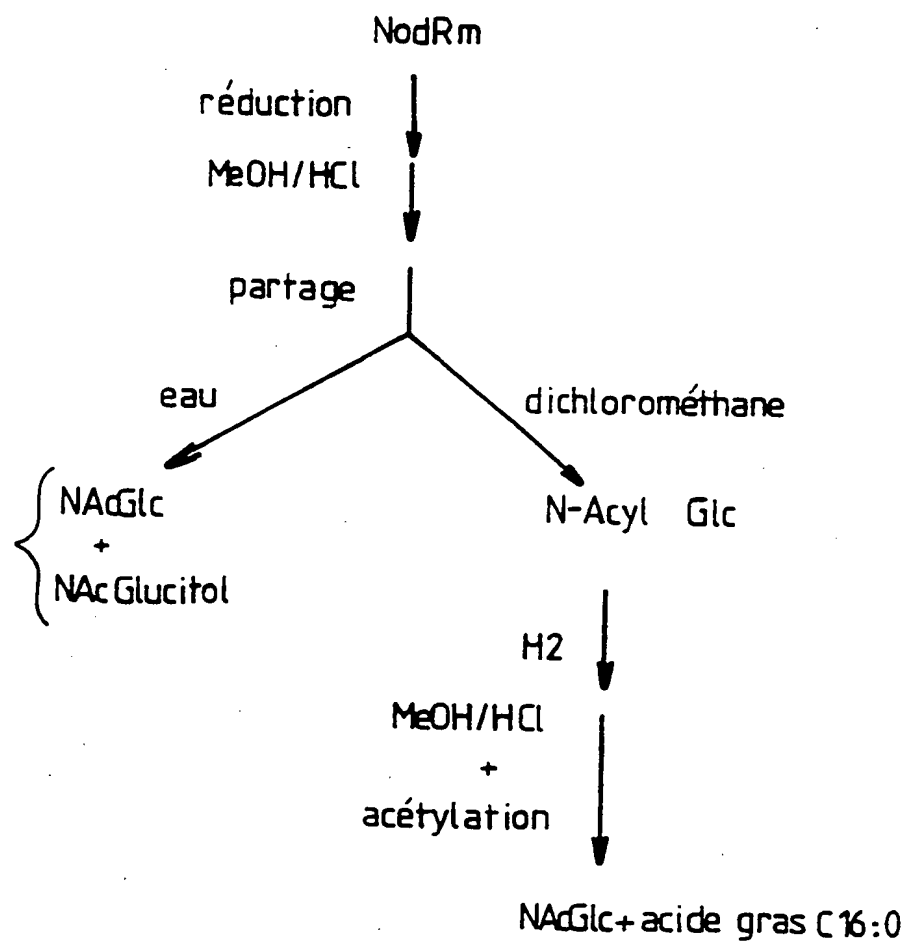


6/16

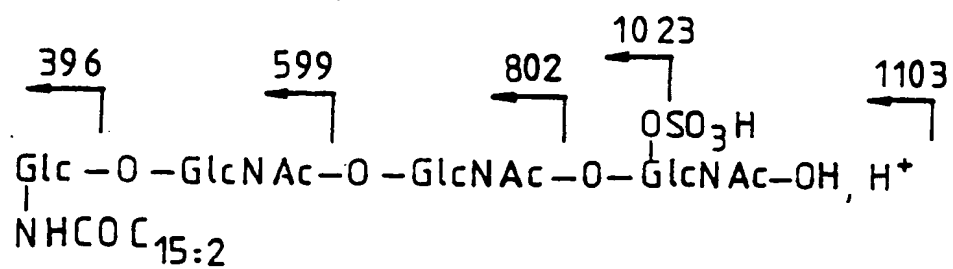
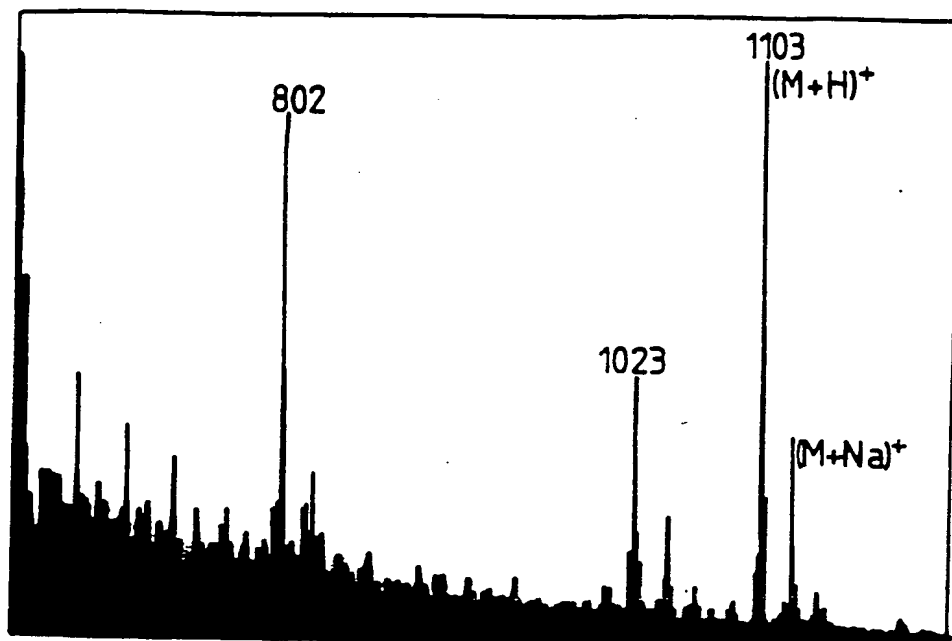
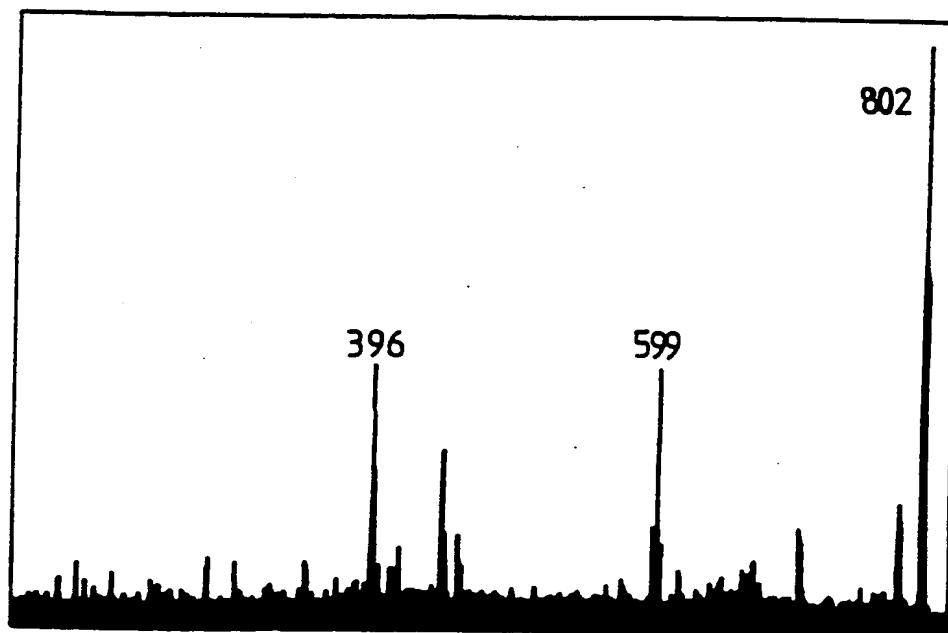
FIG.2.4

FIG.2.5

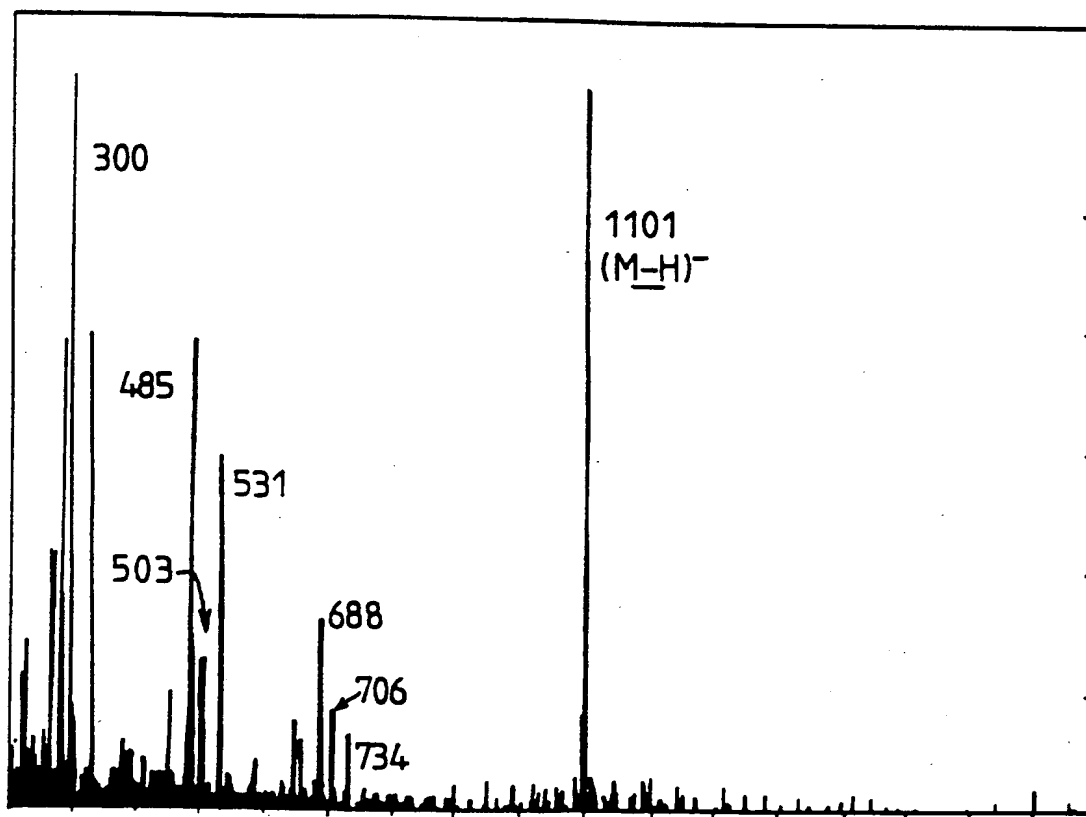
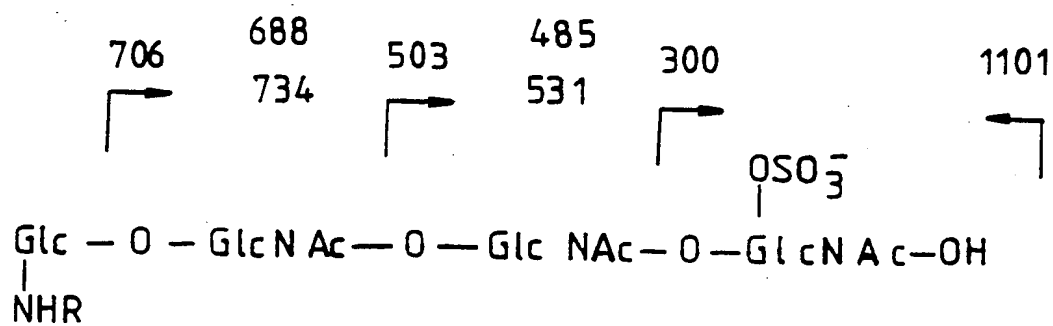
8/16

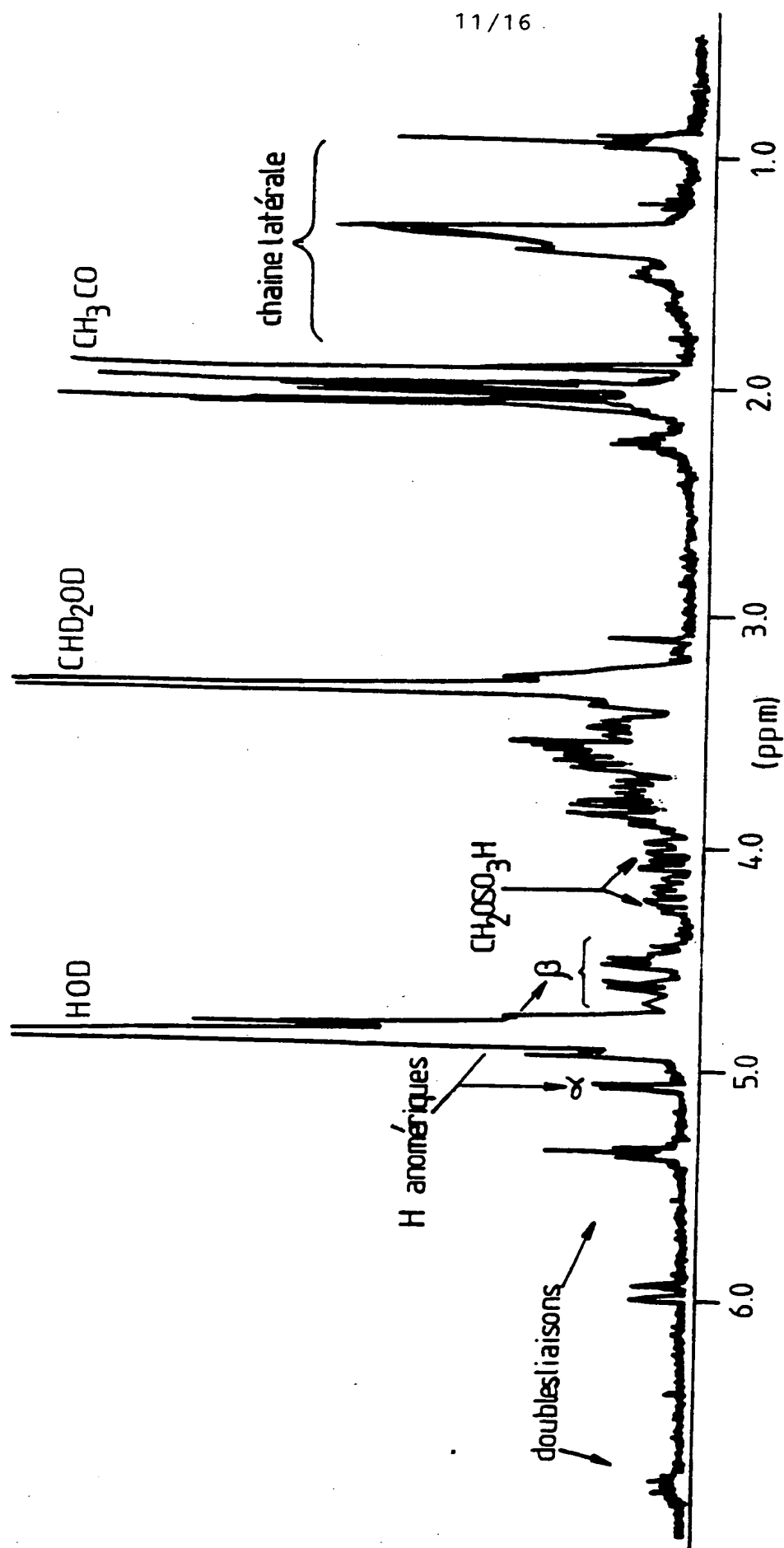
FIG.3

9/16

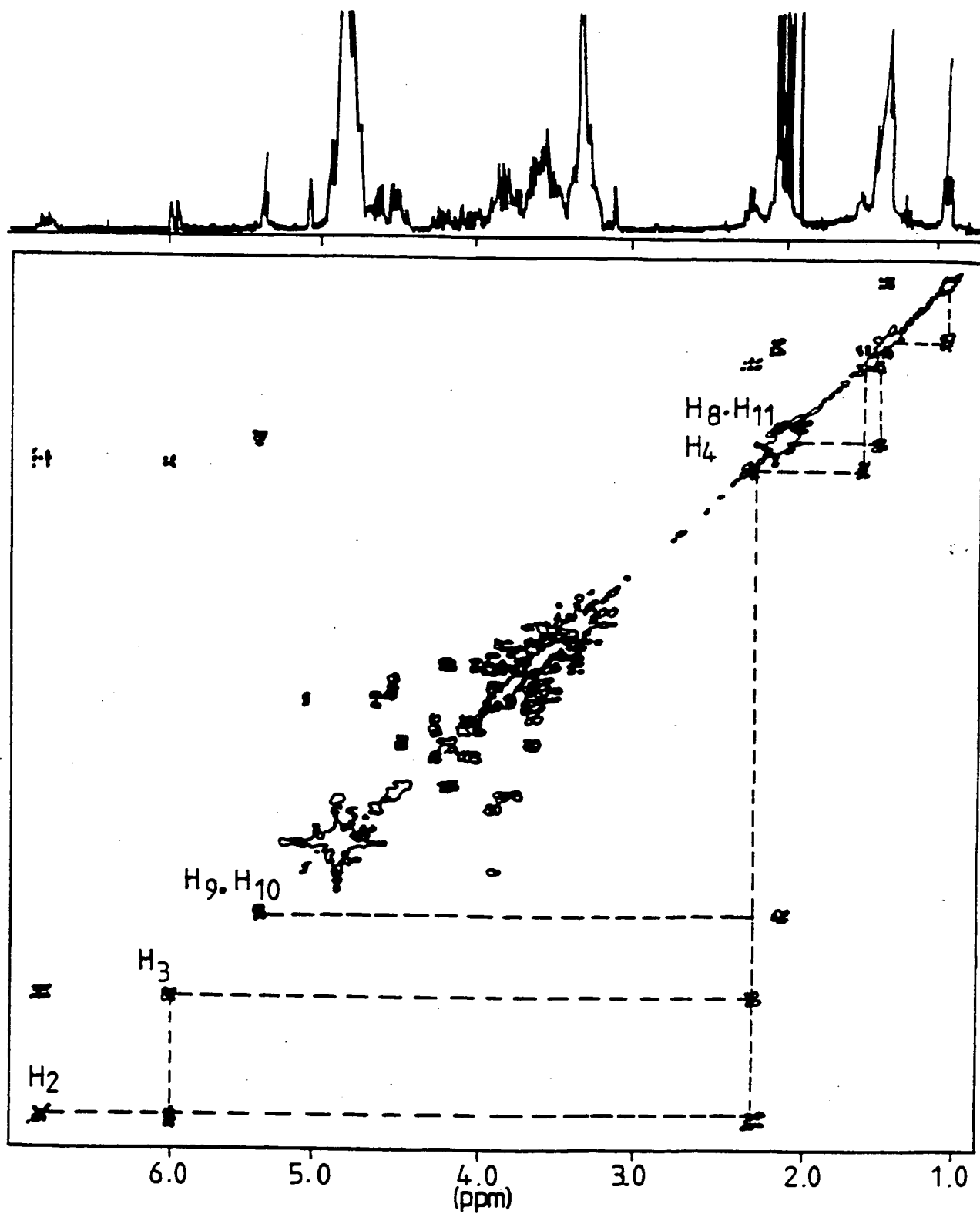
FIG.4.1FIG.4.2

10/16

FIG.4.3

FIG.5.1

12/16

FIG.5.2

13/16

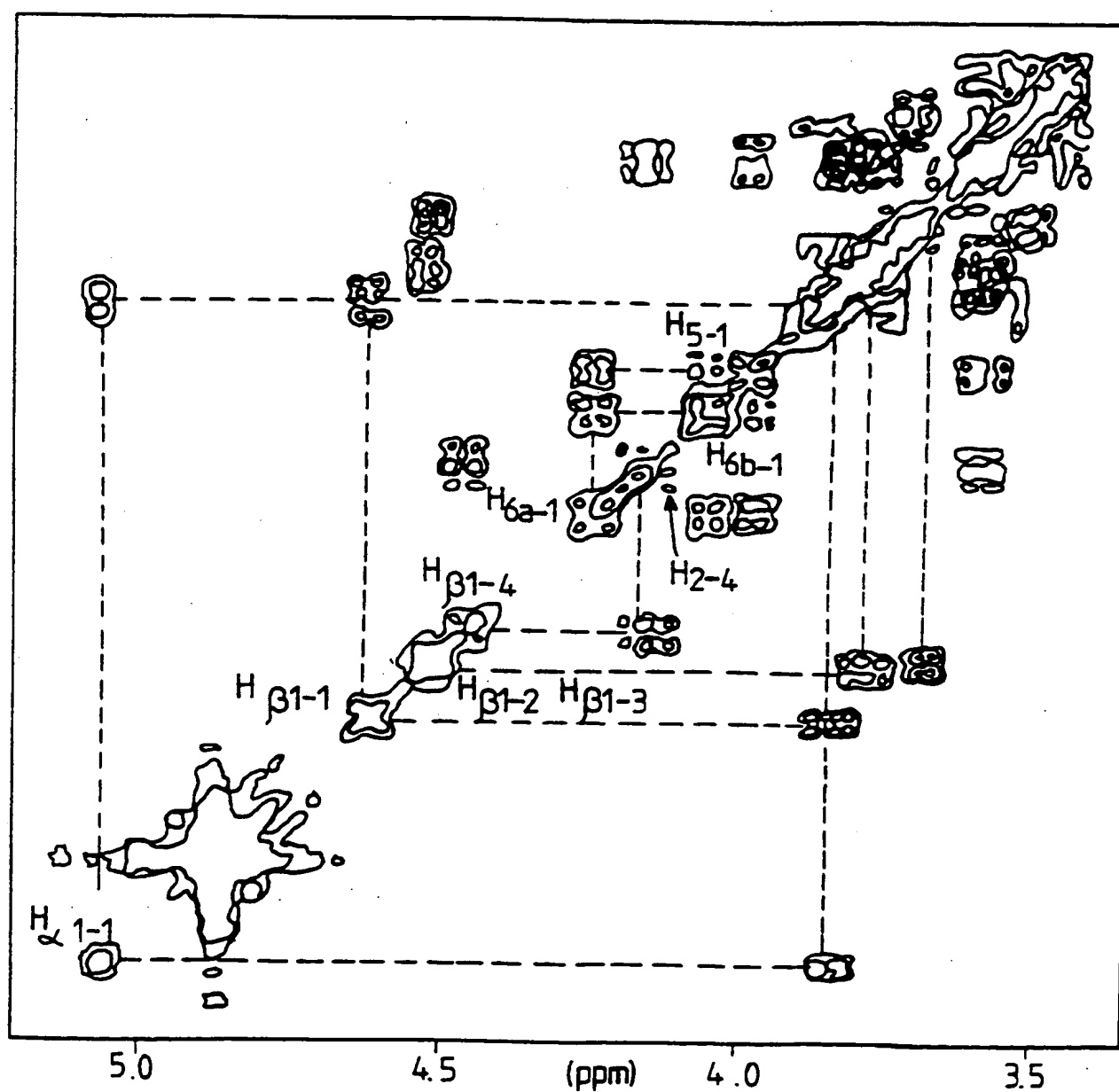
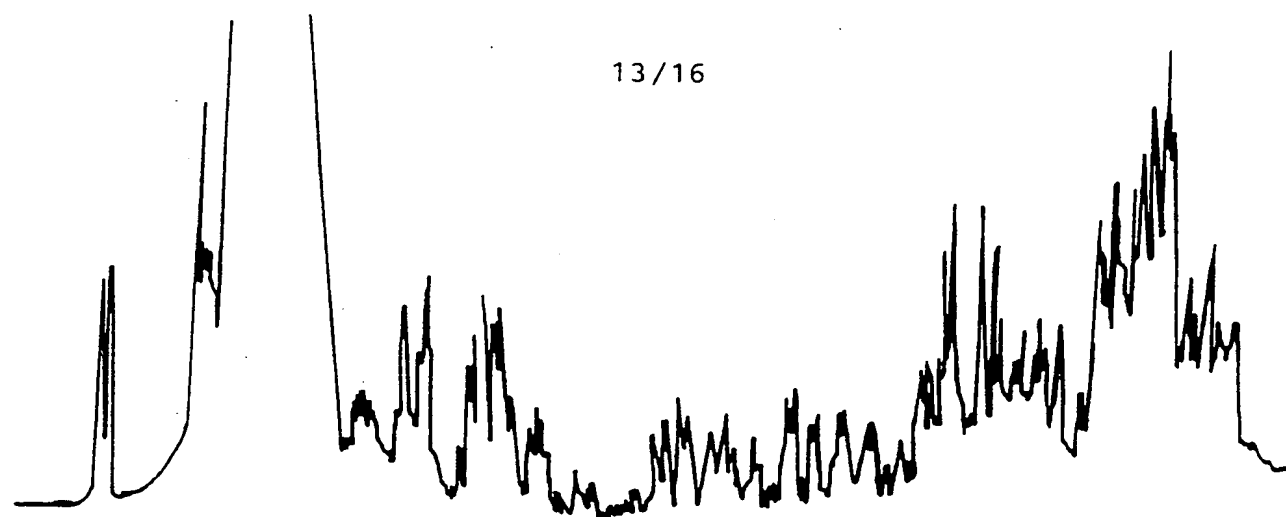
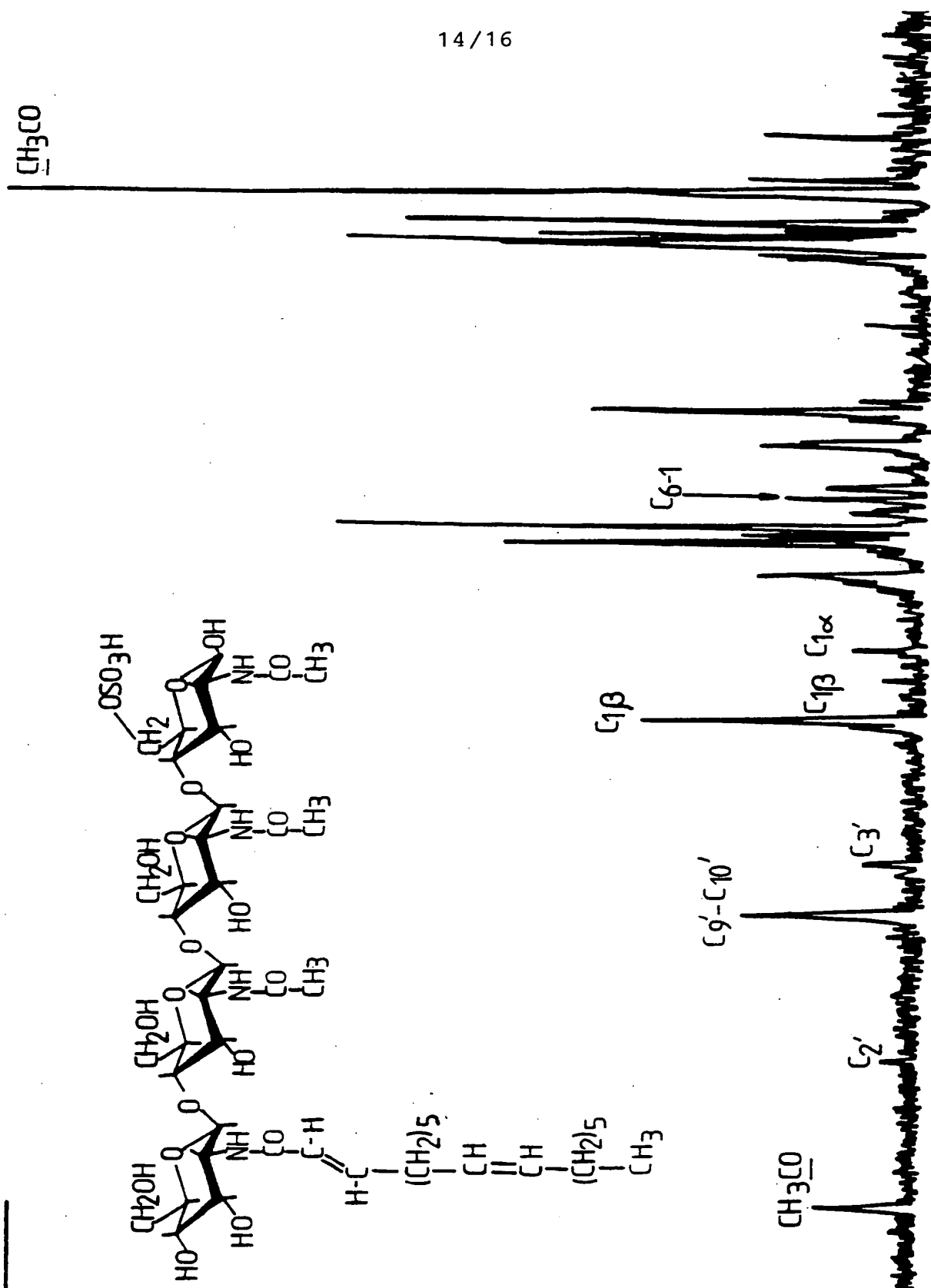


FIG.5.3

14/16

FIG. 5.4

15/16

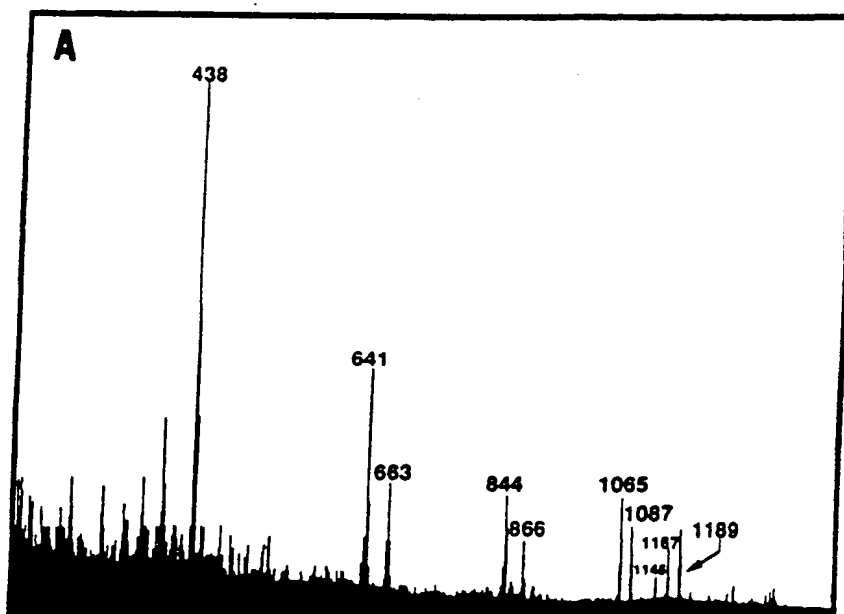


FIG. 6-A

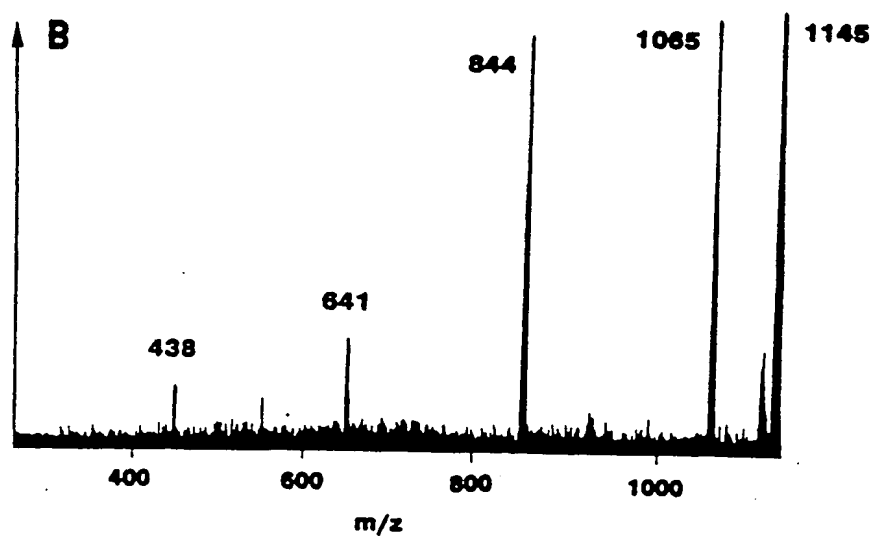


FIG. 6-B

16/16

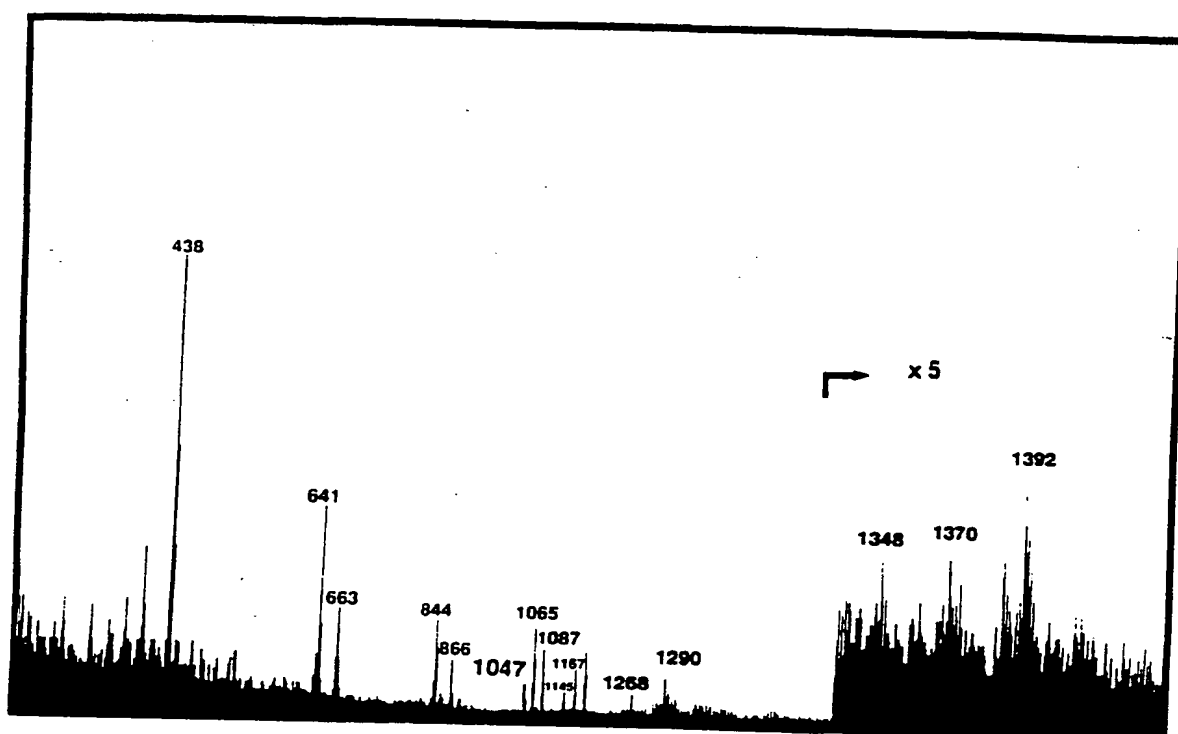


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00283

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ : C 07 H 13/06, C 12 P 19/04		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C 07 H 13/00, C 12 P 19/00	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁸		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	Chemical Abstracts, vol. 102, no. 3, 21 January 1985, (Columbus, Ohio, US), M. Abe et al.: "Stimulation of clover root hair infection by lectin-binding oligosaccharides from the capsular and extracellular polysaccharides of <i>Rhizobium trifolii</i> ", see page 416, abstract 21445p, & J. Bacteriol 1984, 160 (2), 517-20	1-3,11

X	Chemical Abstracts, vol. 110, no. 25, 19 June 1989, (Columbus, Ohio, US), see page 689, abstract 232023c, & JP, A, 63255294 (IHARA CHEMICAL INDUSTRY CO. LTD) 21 October 1988	4,11,13

X	DE, A, 3735365 (MEIJI) 21 April 1988 see page 2, claims 1,2; page 8, lines 44-68; page 28, line 60 - <u>page</u> 29, line 45	1-3,11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
5 July 1991 (05.07.91)		27 August 1991 (27.08.91)
International Searching Authority European Patent Office		Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	WO, A, 8706796 (AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY) 19 November 1987 see claims 1-10 -----	1-3, 11
P, X	Nature, vol. 344, 19 April 1990, P. Lerouge et al.: "Symbiotic host- specificity of <i>Rhizobium meliloti</i> is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal", pages 781-784 see the whole article -----	1-11

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9100283

SA 46894

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 22/08/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A- 375365		None	
WO-A- 8706796	19-11-87	AU-A- 7398787	01-12-87
		EP-A- 0326545	09-08-89
		JP-T- 2500002	11-01-90

EPO FORM P0479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 91/00283

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) *		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : C 07 H 13/06, C 12 P 19/04		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée *		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 07 H 13/00, C 12 P 19/00	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté *		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
X	Chemical Abstracts, vol. 102, no. 3, 21 janvier 1985, (Columbus, Ohio, US), M. Abe et al.: "Stimulation of clover root hair infection by lectin-binding oligosaccharides from the capsular and extracellular polysaccharides of <i>Rhizobium trifolii</i> ", voir page 416, résumé 21445p, & J. Bacteriol. 1984, 160(2), 517-20 --	1-3,11
X	Chemical Abstracts, vol. 110, no. 25, 19 juin 1989, (Columbus, Ohio, US), voir page 689, résumé 232023c, & JP, A, 63255294 (IHARA CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD) 21 octobre 1988 --	4,11,13
X	DE, A, 3735365 (MEIJI) 21 avril 1988 voir page 2, revendications 1,2; page 8, lignes 44-68; page 28, ligne 60 - page 29, ligne 45 -- ./.	1-3,11
<p>* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
5 juillet 1991	27.08.91	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé miss T. MORTENSEN <i>[Signature]</i>	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
X	WO, A, 8706796 (AUSTRALIAN NATIONAL UNIVERSITY) 19 novembre 1987 voir revendications 1-10 --	1-3,11
P,X	Nature, vol. 344, 19 avril 1990, P. Lerouge et al.: "Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal", pages 781-784 voir l'article en entier -----	1-11

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100283
SA 46894

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 22/08/91
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE-A- 375365		Aucun	
WO-A- 8706796	19-11-87	AU-A- 7398787	01-12-87
		EP-A- 0326545	09-08-89
		JP-T- 2500002	11-01-90

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

This Page Blank (uspto,